FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1957 N°

THESE

482

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

BROER YVONNE

Née le 30 Mars 1924 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 1957

ESSAI DE

SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES BILIAIRES DANS LES URINES

EVALUATION QUANTITATIVE de l'ACIDE CHOLIQUE

PRESIDENT : Monsieur le Professeur Maurice BARIETY

R. VEZIN - 48, rue de la Santé - PARIS

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1957 N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

BROER YVONNE

Née le 30 Mars 1924 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 1957

ESSAI DE

SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES BILIAIRES DANS LES URINES

R. UNIV BIBLIOTHEEK LEIDEN

EVALUATION QUANTITATIVE de l'ACIDE CHOLIQUE

PRESIDENT : Monsieur le Professeur Maurice BARIETY

R. VEZIN - 48, rue de la Santé - PARIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550212_0027

Doyen Honoraire : M. BAUDOUIN

Professeurs Honoraires : MM. BAUDOUIN, BERNARD(H) BROCQ (P), CADENAT, CARNOT, CHABROL, CHAMPY, CHEVASSU, DEBRE (R) DELBET, DONZELOT, GASTINEL, GUILLAIN, HALPHEN, HARVIER, LAROCHE(G) LAUBRY, LEMAITRE, LEVY-SOLAL, LHERMITTE, LIAN, LOEPER, MARION, MATHIEU, MOSQUOT, MONDOR, MULON, OLIVIER (E), RICHET (Ch), SANNIE, SEZARY, TANON, VELTER.

Doyen : . . . . . Léon BINET
Membre de l'Institut

Assesseur : . . . . . Jean VERNE

I.- PROFESSEURS :

Anatomie		CORDIER (G.)
Anatomie Pathologique		DELARUE (A.)
Bactériologie		FASQUELLE (R.)
Biologie appliquée à l'Educ. Phy. et Sports		CHAILLEY-BERT (P)
Biologie Médicale		FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et Sociale		JEAN-BERNARD
Chimie Médicale		JAYLE (M.F.)
Cliniques Chirurgicales	Hotêl-Dieu	MENEGAUX
	Beaujon	SICARD (A)
	Salpêtrière	MOULONGUET (P.)
	Cochin	QUENU (J.)
Clinique Chirurgicale réparatrice et Horto.		MERLE D' AUBIGNE(R.)
Clinique de Cardiologie		MOUQUIN (M.)
Clinique de Chirurgie Cardio-vasculaire		de CAUDART D'ALLAINES
Clinique de Chirurgie Infantile et d'Ortho.		FEVRE (M.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire		Monod (R.)
Clinique de la tuberculose		BERNARD (E.)
Clinique de neuro-chirurgie		PETIT DUTAILLIS (D.)
Clinique de puériculture		LELONG (M.)
Clinique des maladies cutanées et syphil.		DEGOS (R.)
Clinique des maladies du sang		CHEVALLIER (P)
Clinique des maladies du système nerveux		ALAJOUANINE (T.)
Clinique des maladies des enfants		CATHALA
Clinique des maladies infectieuses		MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et encéphale		DELAY (J.)
Clinique gynécologique		FUNCK-BRENTANO (P.)
Cliniques Médicales	Hotel-Dieu	BARIETY (M.)
	Bichat	JUSTIN-BESANCON
	Cochin	MOREAU (R.)
	Broussais	DE GENNES (L.)
Clinique médicale d'hydro-climato. thérap.		DEBRAY
Clinique médicale propédeutique	PASTEUR	VALLERY-RADOT (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition		BOULIN (R.)

Cliniques obstétricales	Tarnier	LANTUEJOUL (P.)
	Baudelocque	LACOMME (M.)
	Port-Royal	VARANGOT
Clinique ophtalmologique		RENARD
Clinique oto-rhino-laryngologique		AUBIN (A.)
Clinique physio-pathologique problèmes aliment.		HAMBURGER
Clinique psychiatrique infantile		HEUYER
Clinique rhumatologique et sociale		COSTE (F.)
Clinique stomatologique		DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale		SENEQUE (J.)
Clinique thérapeutique médicale		LEMAIRE (A.)
Clinique urologique		FEY (B.)
Embryologie		GIROUD (A.)
Génétique médicale		LAMY (M.)
Histoire de la médecine et chirurgie		SOULIE
Histologie		VERNE (J.)
Hygiène et clinique de la première enfance		TURPIN
Hygiène et médecine préventive		JOANNON (C.)
Médecine du travail		DESOILLE (H.)
Médecine légale		PIEDELIEVRE (R.)
Parasitologie et histoire naturelle médicale		GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale		N...
Pathologie exotique		LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée		LENEGRE (J.)
Pathologie humorale et immunologie expérimentale (chaire à titre personnel)		MERKLEN (F.P.)
Pathologie médicale		DECOURT
Pathologie et thérapeutique générale		GARCIN (J.)
Pédiatrie sociale		MARIE (J.)
Pharmacologie et matière médicale		HAZARD (R.)
Physico-chimie médicale (chaire à titre pers.)		DOGNON (A.)
Physiologie		BINET (L.)
Physique médicale		STROHL (A.)
Radiologie médicale		DEGREZ (H.)
Technique chirurgicale		PATEL
Thérapeutique		N...

II.- PROFESSEURS SANS CHAIRE
MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES ET AGREGES

Anatomie	DELMAS, A. pr. s. ch. DEBEYRE, J. OLIVIER CABROL, C.
Anatomie pathologique	GAUTIER VILLARD, Mlle P. pr.s.ch. BUSSER, F. GOUYGOU, Ch.
Bactériologie	NEVOT, A. CHRISTOL, D.

Biochimie médicale	ETTORI, J. pr. s; ch. N... N...
Dermato-Syphiligraphie	DUPERRAT, F.
Biologie médicale	BOURLIERE, F.
Embryologie	TUCHMANN
Histologie	N... N... N...
Hydrologie	CORNET
Hygiéne	BOYER, J. pr. s. ch. DEPARIS, M. pr. s. ch.
Maladies infectieuses	BASTIN
Médecine légale et travail	DEROBERT, L. pr. s. ch. GAULTIER, M. HADENGUE, A. ALBAHARY
Neurochirurgie	DAVID, M.
Neurologie	LHERMITTE
Obstétrique	GRASSET, J. LEPAGE, F. MERGER, R. MORIN, P. RAVINA, J. ROBEY, M. LE LORIER
Ophtalmologie	DESVIGNES, P. BREGEAT
Orthopedie	JUDET, R.
Ote-rhino-laryngologie	AUBRY, M. MADURO, R.
Parasitologie	CHABAUD, A. N...
Patologie chirurgicale	ABOULKER, P. BAUMANN, J. GOSSET, J. LAURENCE, G LORTAT JACOB, J. OLIVIER, Cl. POILLEUX, F. VERNE, J.M. DUBOST MATHEY FLABEAU CAUCHOIS FAUREL

Pathologie expérimentale	BARCAT GERMAIN THOMERET LOEPER MAURICE
Patologie médicale	BOUDIN, G. CASTAIGNE, P. CONTE, M. DOMART, A. LAMOTTE, M LAROCHE, Cl. MILLIEZ, P. PEQUIGNOT, H. PERRAULT, M. RAMBERT, P. THIEFFRY, St. TURIAF, J. BRICAIRE ROYER BRISSAUD DEROT BOUVIER MACREZ WOLFROMM
Pédiatrie	JOSEPH, R. MOZZICONACCI, P. POLONOVSKY
Pharmacologie	CHEYMOL, J. pr. s. ch. LEVY, Mlle j. pr. s. ch.
Physiologie	BARJETON, J. pr. s. ch. PARROT, J. pr. s; ch. DEJOURS, P.
Physique médicale	DJOURNO, A. pr. s. ch. GOUGEROT, L.
Pneumo-Phtisiologie	KREIS, B.
Psychiatrie	PICHOT
Psychiatrie infantile	MICHAUX, Z.
Rhumatologie	DELBARRE
Stomatologie	CHAPUT, Mme A. CERNEA, P.
Thérapeutique	CHASSAGNE
UROLOGIE	KUSS, R.

III.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

à titre permanent

Clinique chirurgicale	AMELINE, A. HUGUIER, J. LEGER, L. PADOVANI, P. ROUX, M. RUDLER, J.C.
Clinique médicale	BROUET, G. N... DREYFUS, Gilbert HAGUENAU, M. pr. s. Ch. KOURILSKY, R. MARCHAL, G.
Clinique obstétricale	ECALLE, G. MAYER, M.
Clinique ophtalmologique	OFFRET, G.
Clinique urologique	COUVELAIRE, R.

==========

Secrétaire général de la Faculté.... M. MOREL, J.
Secrétaire ..... Mlle CHAINTREUIL, C.

Conservateur, chargé de la direction M. le Dr. HAHN, A.
Conservateur ..... Mlle GOICHON
Bibliothécaire ..... Mlles DUMAITRE,P.
LAURENT, H. LE NOIR, G. QUIEVREUX,E.

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n' entend leur donner aucune approbation ni improbation.

==========

A LA MEMOIRE DE MA MERE,

A LA MEMOIRE DE MON PERE,

A MA FAMILLE,

A MES AMIS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur Maurice BARIETY,

Professeur à la Clinique Médicale de l'HOTEL-DIEU,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine,

Qui nous a fait le très grand honneur
d'accepter la présidence de
cette thèse,

QU'IL VEUILLE BIEN ACCEPTER ICI,

L'EXPRESSION

DE NOTRE RESPECTUEUSE ADMIRATION.

A LA MEMOIRE de Monsieur le DOYEN Alphonse BAUDOUIN,

En Témoignage de reconnaissance
pour la bienveillance qu'il
nous a toujours prodiguée.

A Monsieur le Professeur Henri BENARD,

Professeur Honoraire de la Clinique Médicale de l'HOTEL-DIEU,

Secrétaire Perpétuel de l'Académie Nationale de Médecine,

Qui nous a fait le très grand honneur de nous confier un de ses sujets préférés.

La réalisation de ce travail n'a été rendu possible que grâce à ses conseils bienveillants et constants.

QU'IL VEUILLE BIEN ACCEPTER ICI, L'EXPRESSION de TOUTE NOTRE ADMIRATION et l'ASSURANCE d'un TRES RESPECTUEUX ATTACHEMENT.

A Mademoiselle le Docteur M. TISSIER,

Qui nous a initiée au laboratoire et à qui nous devons le meilleur de notre formation technique.

A Mademoiselle le Docteur T. MELIK,

Qui ne nous a jamais ménagé sa sympathie.

A MES COLLEGUES ET AMIS,

du laboratoire de la Clinique Médicale de l'HOTEL-DIEU,

du laboratoire de Recherches de l'Académie Nationale de Médecine,

En remerciement de leur
affectueux attachement.

INTRODUCTION

L'étude des sels biliaires dans le sang et les urines se heurte à des difficultés techniques qui constituent autant d'obstacles pour les applications à la clinique.

La mesure des modifications apportées à la tension superficielle, ne représente, comme l'ont montré CHABROL, BENARD et BARIETY (1), qu'un procédé très indirect et sujet à de nombreuses incertitudes.

Les méthodes les plus fidèles restent celles qui sont basées sur la réaction de PETTENKOFER ; mais cette réaction est loin d'être spécifique, et ne prend quelque valeur, qu'au prix d'un isolement, au moins relatif, des sels biliaires à rechercher ou à doser.

Au cours de ces dernières années, les précieuses méthodes de chromatographie, sur colonne ou sur papier, ont été mises à profit pour tenter cet isolement.

C'est ainsi que, dès 1941, CRIPPA et MAFFEI (2) ont eu recours à la chromatographie d'adsorption sur colonne d'alumine. Utilisant comme éluant l'alcool méthylique pur, ils ont réussi à dissocier des mélanges artificiels d'acides déhydrocholique, cholique, déhydrodésoxycholique et désoxycholique.

Plus récemment, la technique de chromatographie sur alumine a été reprise par TETSUZO-ARIMA (3). Procédant à des élutions méthodiques par l'alcool éthylique additionné de 5 % d'acide acétique, cet auteur parvient à séparer les acides cholique et désoxycholique libres de leurs homologues conjugués qui demeurent plus longtemps dans la colonne.

Parallèlement, de nombreuses recherches ont été faites par la chromatographie de partage. BERGSTRÖM et SJOVAL (4) en 1951 ont mis à profit la technique de HOWARD et MARTIN (5) de " Reversed-phase partition chromatography " sur colonne (voir p. 50), plus simple que la technique à contre-courant utilisée par AHRENS et CRAIG (6). Ils utilisent une colonne d'Hyflo-Super-cel (terre d'infusoire) dont les propriétés ont été modifiées par réaction préalable de vapeurs de diméthyldichlorosilane ; la phase stationnaire est constituée par du chloroforme additionné de 10 % d'heptane, la phase mobile par divers mélanges d'alcool méthylique et d'eau. La méthode permet la séparation des acides cholique, désoxycholique et lithocholique. Elle a été développée et perfectionnée, par la suite, par SJOVAL.

Plus simple encore que la technique sur colonne, est la chromatographie de partage sur papier. Elle a été appliquée aux acides biliaires par KRITCHEVSKY et KIRK (7), par TANAKA et TAKEDA (8) , et par SJOVAL (9). Ce dernier auteur utilise des bandes de papier Watman 3 MM ; la phase stationnaire est représentée par de l'acide acétique à 70 %, et la phase mobile par un mélange d'éther isopropylique et d'heptane en proportions variables. La détection des taches est faite par pulvérisations d'alcool absolu renfermant 10 % d'acide phosphomolybdique. Procédant par chromatographie ascendante ou descendante, avec une phase mobile adéquate, SJOVAL parvient à isoler l'acide hyodésoxycholique, cholique, lithocholique, et leurs formes conjuguées.

Enfin, tout récemment, LAMBIOTTE (10) cherchant à séparer lessels biliaires de la masse des acides gras qui leur sont associés dans les tissus, a fait appel à la méthode de MOOR et STEIN (II) de chromatographie sur résines synthétiques, jouant le rôle d'échangeurs d'ions. L'emploi de Dowex 2 forme. OH, ou d'Amberlite Ira-400 (OH) avec élution par l'acide chlorhydrique dilué, ou par un mélange salin, lui a permis une récupération des acides désoxycholique et glycodésoxycholique, hautement prédominants chez le lapin.

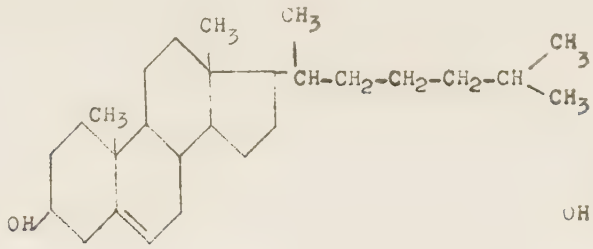
Comme on le voit, la séparation chromatographique des sels biliaires est un problème de grande actualité.

Ce sont des essais que nous avons faits nous-mêmes, que nous nous proposons de rapporter ici.

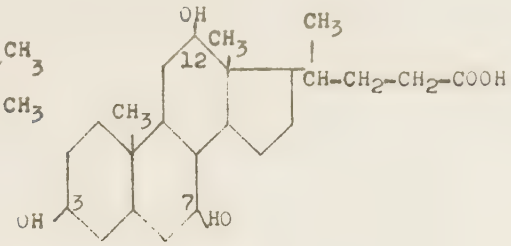
Ne pouvant envisager le problème dans toute son étendue, nous nous sommes limités à la chromatographie d'absorption sur colonne, en ayant plus spécialement en vue son application aux urines.

Il s'est agi pour nous, moins de séparer les acides biliaires entre eux, que d'éssayer de les isoler de substances adventices susceptibles d'interférer dans la réaction de PETTENKOFER.

Cette étude ne nous a été possible que grâce aux conseils et aux critiques que le Professeur Henri BENARD n'a cessé de nous prodiguer. Nous remercions également Mademoiselle le Docteur M. TISSIER de l'aide précieuse qu'elle a bien voulu nous apporter.

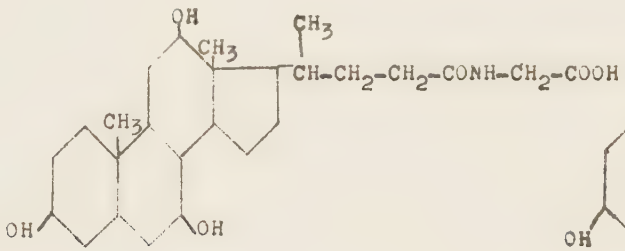


CHOLESTEROL

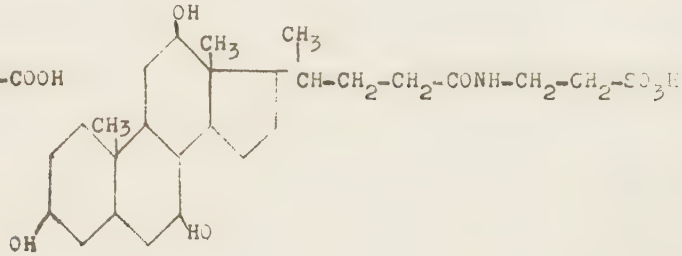


ACIDE CHOLIQUE

FIGURE 1



ACIDE GLYCOCHOLIQUE



ACIDE TAUROCHOLIQUE

FIGURE 2

CHAPITRE I

RAPPEL CHIMIQUE SUR LA CONSTITUTION DES SELS BILIAIRES

Les sels biliaires sont des représentants de la grande famille du cholestérol. Ils possèdent en effet le noyau perhydro 1-2-cyclopenténophénantrène. Leurs formules diffèrent de celle du cholestérol par plusieurs caractères, notamment par la perte de la double liaison en Δ 5 et par l'amputation de trois carbones terminaux de la chaîne latérale, avec oxydation en carboxyle du carbone devenu terminal, (Fig. 1).

C'est le carboxyle qui permet aux acides biliaires de se conjuguer au glycocolle ou à la taurine, cette conjugaison se faisant en proportions respectives variables suivant les espèces animales, mais intéressant toujours une fraction importante des acides biliaires totaux de la bile et des urines. (Fig. 2).

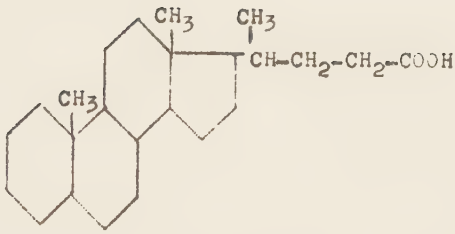
Le groupe des acides biliaires comprend une série de composés qui peuvent être considérés comme des formes diversement oxydées d'acide saturé, l'acide cholanique. (Fig. 3).

Comme le montre le tableau ci-après emprunté à FIESER, le nombre de ces composés, actuellement connus, dépasse une vingtaine.

A cette liste viennent s'ajouter, du reste, l'acide cholanique dépourvu de fonction OH, les acides déhydrocholiques, dans lesquels une ou plusieurs fonctions OH sont remplacées par des fonctions cétones. et certains corps voisins des sels biliaires tels que le scymnol et l'acide tétrahydroxycholanique.

De tous ces composés, la nature n'a retenu qu'un nombre relativement restreint dont les plus importants, conjugués ou non, sont :

- l'acide cholique
- les acides désoxycholiques
- l'acide lithocholique.



ACIDE CHOLANIQUE

FIGURE 3

NOM	HYDROXYLES	POINT DE FUSION	POUVOIR ROTATOIRE (α) D	SOURCE
Acide lithocholique	3 α	184°-186°	+ 32°	Homme - boeuf lapin
" 3 β hydroxycholanique	3 β	176°-177°	+ 26°	Synthétique
" 6 α "	6 α	221°-222°	+ 8,5°	"
" 7 α "	7 α	96°-102°		"
" 11 β " (ester méthylé)	11 β	85°-86°	+ 50°	"
" 12 α "	12 α	90°-95°	+ 43,5°	"
" 12 β "	12 β	110°-116°	+ 38°	"
" 3 α ,6 β dihydroxycholanique	3 α,6 β	205°	+ 37°	"
" "α" hyodésoxycholique	3 α,6 α	196°-197°	+ 8°	Porc - sanglier
" "β" "	3 β,6 α	189°-190°	+ 5°	Porc
" 3 β ,6 β dihydroxycholanique	3 β,6 β	250°		Synthétique
" chénodésoxycholique	3 α ,7 α	140°	+ 11°	Homme, Boeuf, oie poule, cobaye
" ursodésoxycholique	3 α ,7 β	203°	+ 57°	Ours
" 3 α ,11 α dihydroxycholanique	3 α ,11 α	147°	+ 22°	Synthétique
" 3 α ,11 β dihydroxycholanique	3 α ,11 β	201°	+ 55°	"
" ester méthylique du 3 acétate		146°-148°	+ 71°	"
" 3 β ,11 β dihydroxycholanique	3 β ,11 β			"
" ester méthylique du 3 acétate		139°-140°	+ 50°	"
" désoxycholique	3 α ,12 α	176°-177°	+ 53°	Homme, boeuf, cerf, chien, mouton, chèvre, antilope, lapin.
" 12 épidésoxycholique	3 α,12 β	186°	+ 38°	Synthétique
" isodésoxycholique	7 α ,12 α	210°-211°	+ 27°	"

NOM	HYDROXYLES	POINT DE FUSION	POUVOIR ROTATOIRE (α) D	SOURCE
Acide 7 ,12 dihydroxycholanique		226°-227°		Synthétique
" 11 ,12 "	11α ,12 α	211°-214°	+ 3,2°	"
" 11 ,12 " (ester méthylique)	11 β,12 β	170,5°-174,5°	+ 56°	"
" bufodésoxycholique				crapaud
" α lagodésoxycholique		156°-157°	+ 80°	lapin
" β "		213°	+ 37°	lapin
" cholique	3 α,7α,12α	196°-198°	+ 37°	Homme, boeuf, chèvre, mouton, antilope.
" 3 α,11 α ,12 α trihydroxycholanique	3 α,11 α ,12 α	173°-175°	+ 31°	Synthétique
" 3 α,11,α,12 β "	3 α,11 α,12 β	164°-166°	+ 45°	"
" 3 α,11β ,12 α "	3 α ,11 β,12 α	145°-147°	+ 54°	"
" 3 α,11 β,12 β "	3 α,11 β,12 β	177°	+ 43°	"
" β phocaecholique	3 ,7 ,23	222°-223°	+ 27°	Morse, phoque.
" nutriacholique		198°		Castor.

III.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent

Clinique chirurgicale	AMELINE, A. HUGUIER, J. LEGER, L. PADOVANI, P. ROUX, M. RUDLER, J.C.
Clinique médicale	BROUET, G. N... DREYFUS, Gilbert HAGUENAU, M. pr. s. Ch. KOURILSKY, R. MARCHAL, G.
Clinique obstétricale	ECALLE, G. MAYER, M.
Clinique ophtalmologique	OFFRET, G.
Clinique urologique	COUVELAIRE, R.

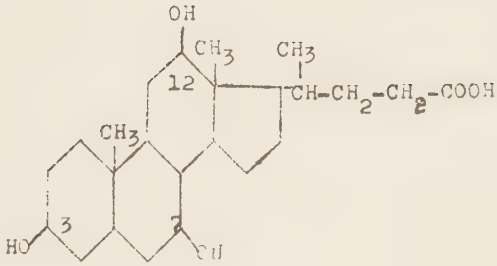
==========

Secrétaire général de la Faculté.... M. MOREL, J.
Secrétaire ..... Mlle CHAINTREUIL, C.

Conservateur, chargé de la direction M. le Dr. HAHN, A.
Conservateur ..... Mlle GOICHON
Bibliothécaire ..... Mlles DUMAITRE, P.
LAURENT, H. LE NOIR, G. QUIEVREUX, E.

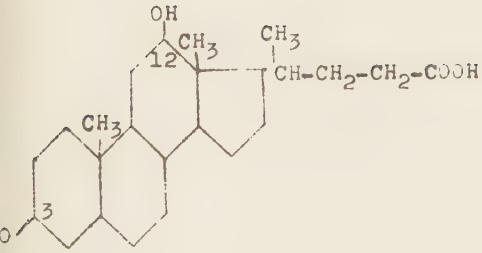
Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

==========



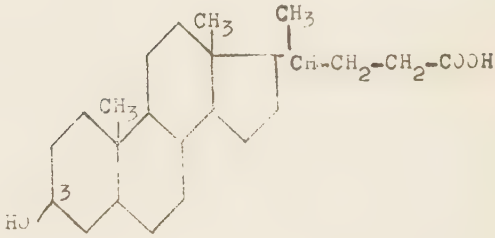
ACIDE CHOLIQUE

FIGURE 4



ACIDE DESOXYCHOLIQUE -3-12-OH.

FIGURE 5



ACIDE LITHOCHOLIQUE

FIGURE 6

CHAPITRE II

RÉACTION DE PETTENKOFER

Il y a déjà plus d'un siècle, en 1844, PETTENKOFER (12) montre que les solutions d'acides biliaires, additionnées d'acide sulfurique concentré et d'une trace de sucre de canne, prenaient sous l'influence de la chaleur, une coloration rouge pourpre.

MYLIUS (13) et UDRANSKY (14) proposèrent de substituer au sucre de canne, une solution de furfurol, et insistèrent sur le peu de spécificité de la réaction, qui est positive avec plus d'une trentaine de substances :

Acétal	Apomorphine
Acétaldéhyde	Benzaldéhyde
Ether acétique	Cholestérine
Acétone	Digitaline
Ethylène glycolle	Acide vinilique
Acide malique	Urée
Amylalcool	Isobutylalcool
Aniline	Isopropylalcool
Métaldéhyde	Acide lévulinique
Alcool méthylique	Acide salicylique
Monométhylaniline	Acide stéarique
Morphine	Scatol
Acide oléique	Toluol
Phénol	Thymol
Phloroglucine	Tyrosine
Résorcine	Aldéhyde valériganique
Salicylaldéhyde	Vanilline

La réaction de PETTENKOFER a subi depuis sa découverte un très grand nombre de variantes qui se ramènent à quatre principales, suivant qu'on utilise l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique, et pour chacun de ces acides, le furfural ou la vanilline.

Dans toutes ces variantes, la nature du sel biliaire, la concentration de l'acide sulfurique ou phosphorique, la durée du

chauffage et le moment envisagé au cours de la cinétique de la réaction, ont une importance considérable.

Avec Mademoiselle TISSIER, nous avons fait une étude méthodique de ces différents facteurs.

Nos recherches ont porté plus spécialement sur les réactions de PETTENKOFER à l'acide sulfurique, en utilisant soit le furfural , soit la vanilline.

A.- REACTION de PETTENKOFER PRATIQUEE SUR l'ACIDE CHOLIQUE avec l'ACIDE SULFURIQUE et le FURFURAL

D'une façon générale, nous avons procédé pour cette réaction de la façon suivante :

- 2 centimètres cubes d'une solution d'acide cholique (0,01 g. dans l'eau) sont additionnés de 5 cm3 d'acide sulfurique concentré. Le mélange est homogénéisé et chauffé quelques minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, on introduit 1,5 cm3 d'une solution aqueuse de furfural à 1 % .

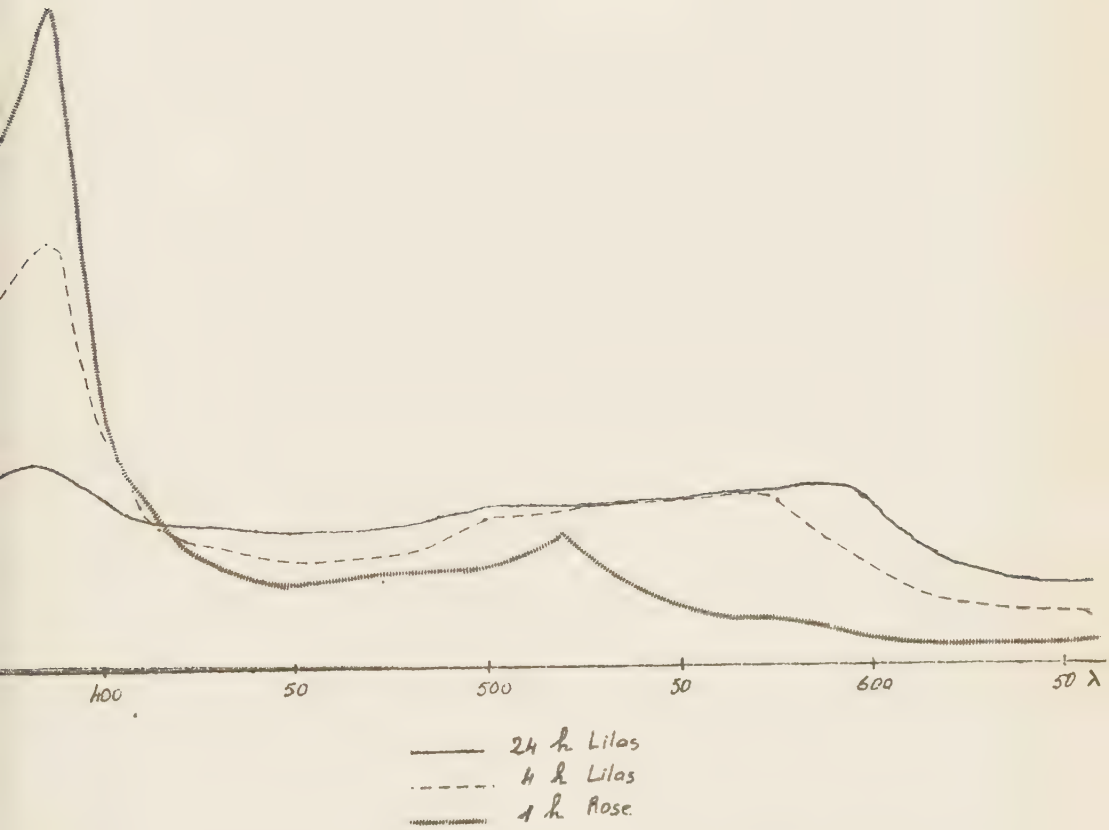
Les lectures sont faites au photomètre à écrans ou au spectrophotomètre, au bout de temps variables, le blanc étant constitué par une réaction similaire où manque l'acide cholique.

a.- CINETIQUE de la REACTION :

En procédant comme il vient d'être indiqué, on obtient une belle réaction de PETTENKOFER, en utilisant un acide sulfurique à 60 % en volume (43 % après mélange à la solution de sels biliaires) et en chauffant au bain-marie durant 7 minutes.

Le milieu, jaune au sortir du bain-marie, prend, sous l'influence du furfural, une coloration rose qui vire au lilas avec le temps.

Les graphiques ci-après, obtenus avec le spectrophotomètre de BECKMAN, montrent la variation du diagramme d'absorption dans un intervalle de 24 heures. On voit la baisse progressive de de l'absorption dans la zone de λ 390. (Fig.)



- FIGURE 7.- Etude cinétique de la réaction de PETTENKOFER pratiquée sur l'acide cholique, selon la modalité sulfurique-furfural à 60 % : densités optiques en fonction des longueurs d'ondes, pour des temps variables écoulés depuis le début de la réaction.

A défaut de spectrophotomètre, on peut utiliser un photomètre à écrans tel que l'appareil à trois cellules de JOBIN et YVON. L'augmentation progressive de l'absorption dans le vert est encore ici évidente. (Fig. 8)

Au bout de 4 heures, les variations pour l'écran 52 deviennent légères. C'est le temps optimum pour procéder à la lecture.

b.- TEMPS de CHAUFFAGE :

La durée du temps de chauffage au bain-marie bouillant (temps qui précède l'introduction du furfural), intervient d'une façon importante sur l'intensité de la réaction.

Les graphiques ci-après montrent les valeurs de l'absorption sous l'écran 58 pour des temps de chauffage différents, la lecture étant faite au bout de 5 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures,30, 24 heures. (Fig. 9)

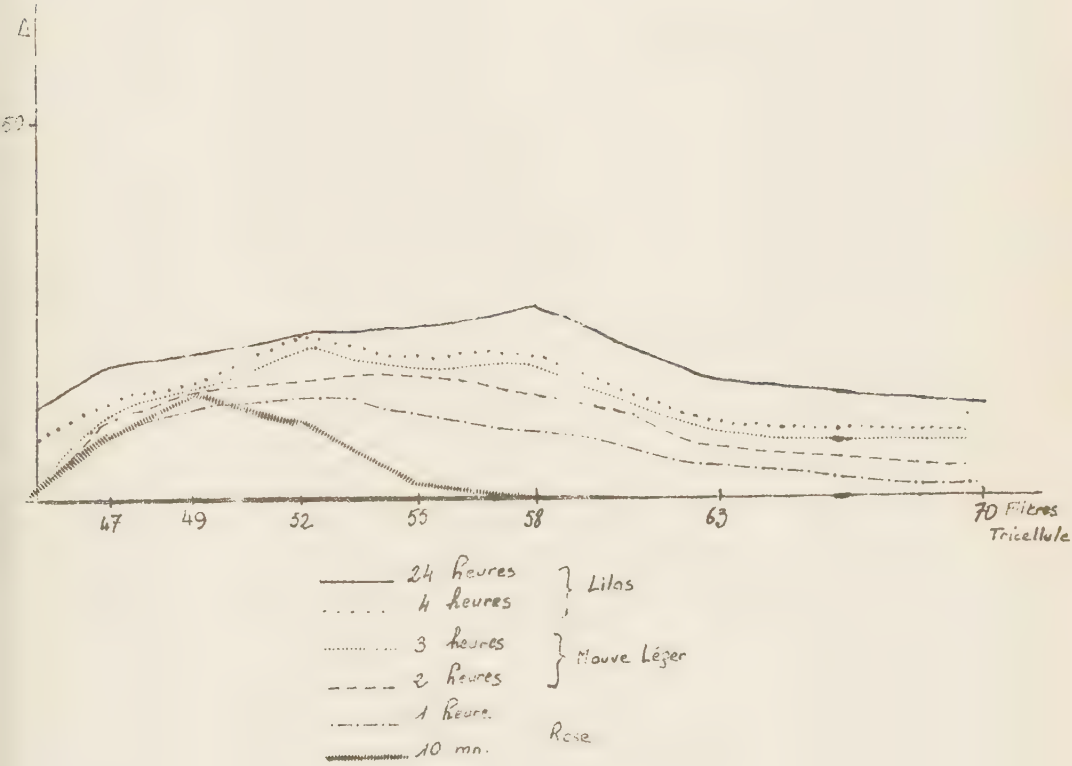
Comme on le voit, l'intensité de la réaction,en fonction de la durée de chauffage, diminue d'abord assez vite, mais au-delà de 5 minutes, la prolongation du chauffage n'a qu'une influence légère. Un séjour au bain-marie bouillant de 7 minutes, offre des garanties de fidélité satisfaisantes.

c.- CONCENTRATION de l'ACIDE SULFURIQUE :

La réaction de PETTENKOFER est très fortement influencée par la concentration de l'acide sulfurique utilisé, et nous verrons que cette influence n'est pas la même pour l'acide cholique et les autres acides biliaires.

En ce qui concerne l'acide cholique, la réaction de PETTENKOFER est déjà très intense avec un acide sulfurique à 60 % (en volume) soit 43 % après mélange avec la solution de sels biliaires.

L'intensité mesurée dans la région spectrale correspondant à l'écran 58, augmente progressivement avec la concentration de l'acide sulfurique, tout au moins jusqu'à une concentration



- FIGURE 8.- Cinétique de la même réaction observée sous différents filtres, à l'aide du photomètre à écrans.

de 90 %, en même temps que la coloration prend une nuance plus saumon. Cette augmentation est surtout manifeste quand la lecture est faite au bout de quelques heures.

La figure ci-après donne les variations de l'absorption sous écran 58 , pour des taux progressivement croissants de l'acide sulfurique utilisé . (Fig.10)

B.- REACTION de PETTENKOFER PRATIQUEE SUR l'ACIDE CHOLIQUE avec l'ACIDE PHOSPHORIQUE et le FURFURAL

Cette réaction exigeant des concentrations élevées en acide phosphorique, celui-ci a été mis en action ,non sur une solution d'acide cholique, mais directement sur un résidu sec de cet acide.

D'autre part, le volume de furfural a été réduit à 1 cm3.

En utilisant un acide phosphorique à 100 % (densité 1,7) et en adoptant pour le temps de chauffage au bain-marie bouillant une durée de 5 minutes, on obtient une coloration rose qui, en une vingtaine de minutes vire au lilas, et en 24 heures au bleu acier.

Le graphique ci-après montre la cinétique de l'absorption, établie au photomètre à écrans . (Fig. 11)

L'influence de la durée du séjour au bain-marie est très comparable à ce que l'on observe avec la modalité sulfurique de la réaction de PETTENKOFER. Entre 1 à 7 minutes de chauffage, on note un plateau horizontal ou de pente décroissante extrêmement faible. (Fig. 12)

En ce qui concerne la concentration de l'acide phosphorique utilisé, le taux de 100 % est celui qui donne la réaction la plus intense. Mais des réactions très nettes , quoique progressivement plus faibles, peuvent être obtenues avec l'acide cholique, en faisant intervenir des acides phosphoriques à 90 et 80 % . (Fig. 13)

Nous verrons qu'au contraire, les acides désoxycholique et lithocholique ne sont décelables et encore très faiblement, qu'avec des acides phosphoriques à 90 et 100 % .

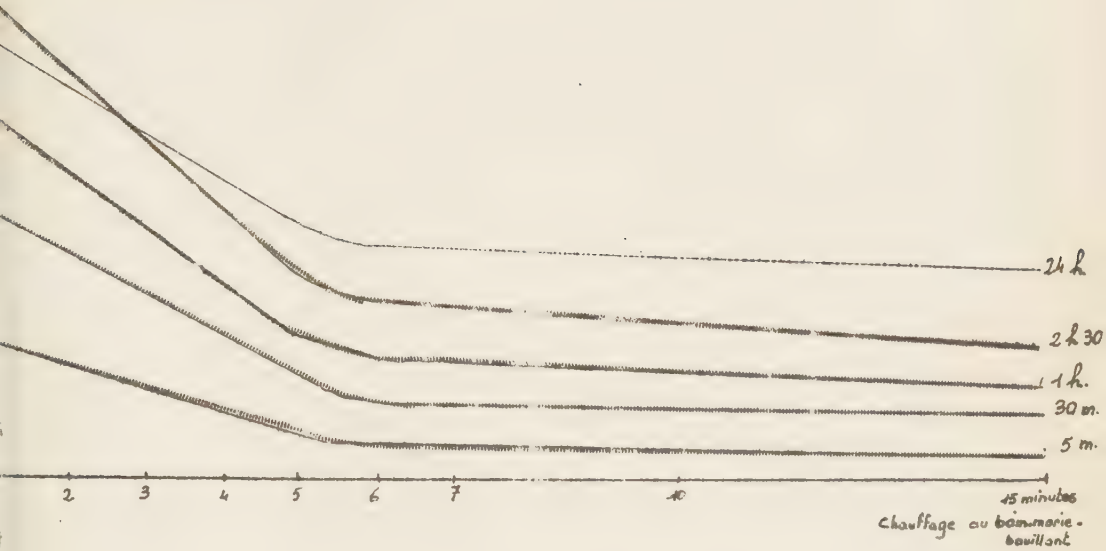


FIGURE 9.- Influence de la durée du temps de chauffage sur la densité optique de la réaction sulfo-furfuralique (filtre 58).

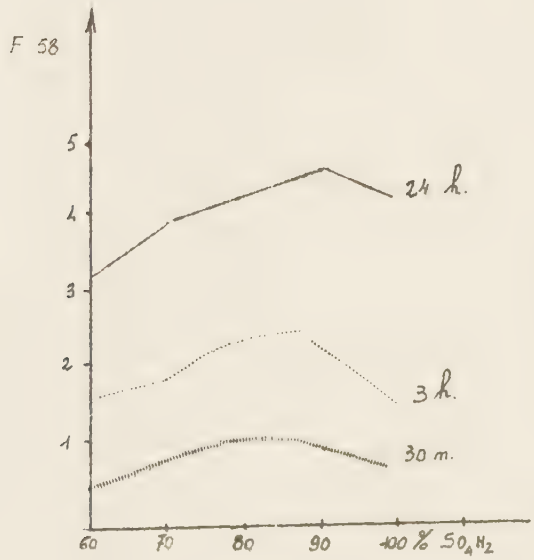
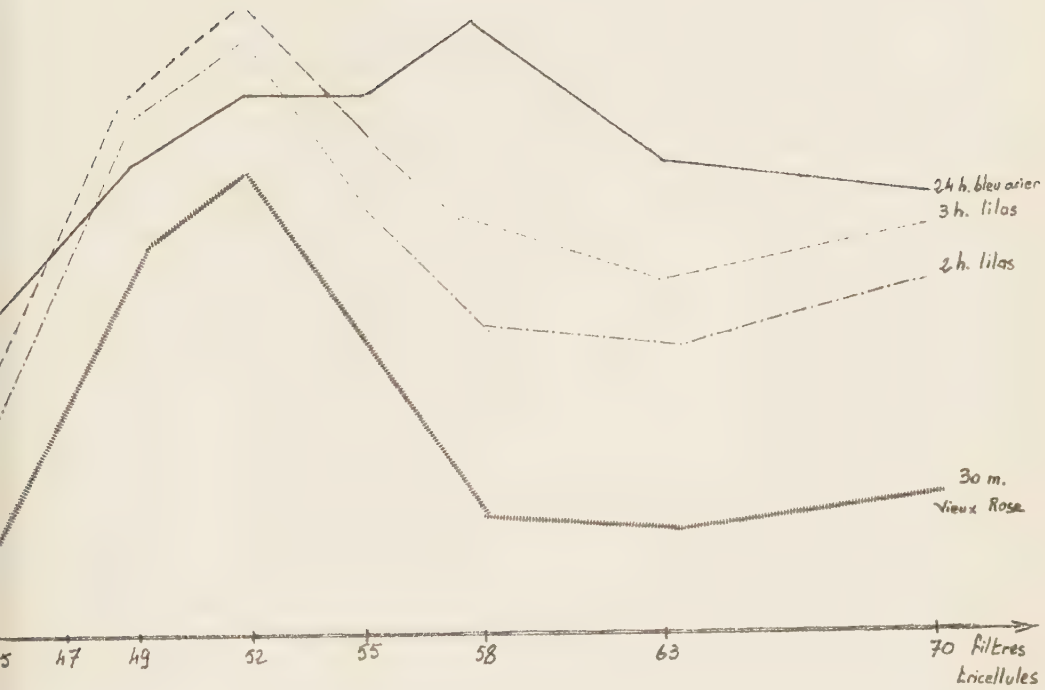
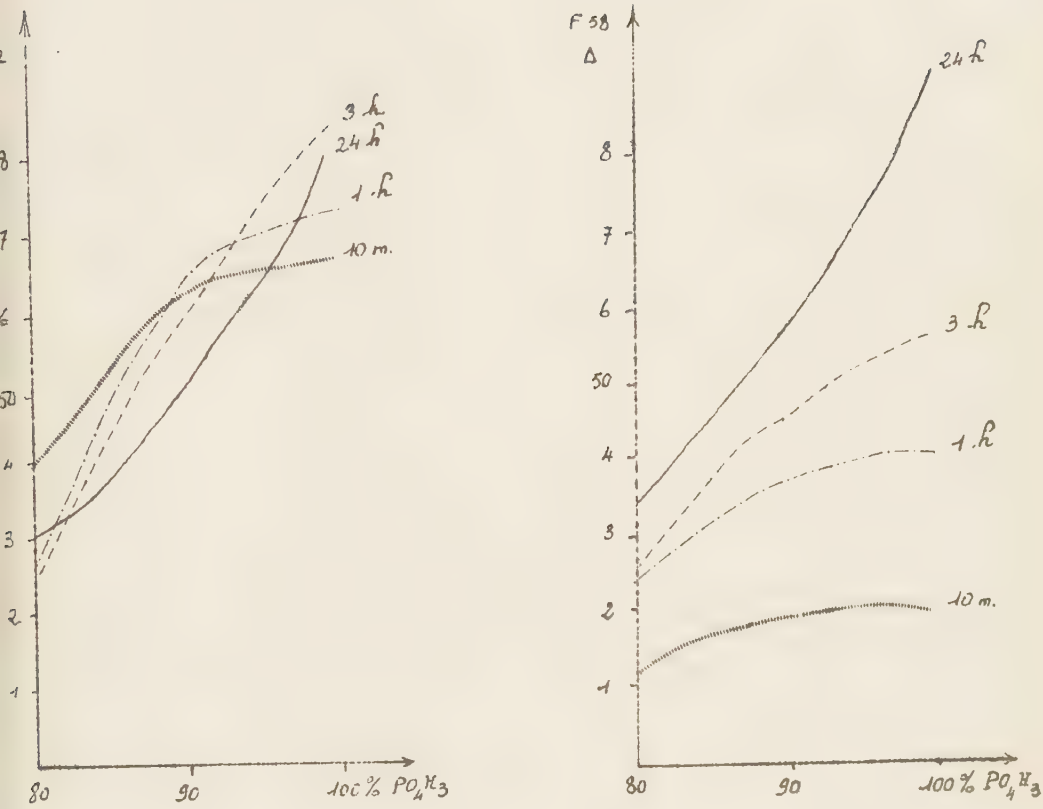


FIGURE 10.- Influence de la concentration de l'acide sulfurique sur la densité optique de la réaction sulfo-furfuralique (filtre 58).



- FIGURE 11.- Réaction de PETTENKOFER sur l'acide cholique, modalité acide phosphorique-furfural (PO4H3 100 %), au photomètre à écrans, pour des temps variables écoulés depuis le début de la réaction.

- FIGURE 12.- Influence de la durée du temps de chauffage sur la densité optique de la réaction phospho-furfuralique (filtre 52).



- FIGURE 13.- Influence de la concentration de l'acide phosphorique sur la densité optique de la réaction phospho-furfuralique (filtres 52 - 58).

-REACTION de PETTENKOFER PRATIQUEE sur l'ACIDE CHOLIQUE avec l'ACIDE PHOSPHORIQUE et la VANILLINE

Si, utilisant un acide phosphorique à 100 % (densité 1, 7), on remplace la solution de furfural par un volume égal d'une solution aqueuse de vanilline à 0,60 %, la réaction de PETTENKOFER donne une coloration rose qui apparaît immédiatement, puis vire à l'orangé au bout d'1 heure et au jaune d'or au bout de 3 heures.

Cette dernière teinte se maintient avec une très légère augmentation d'intensité pendant les 24 heures qui suivent.

Mais si l'on part d'un acide phosphorique à 80 %, toutes choses restant égales par ailleurs, la coloration obtenue est d'une intensité beaucoup plus faible . (Fig. 14 - 15)

.- REACTION de PETTENKOFER PRATIQUEE sur l'ACIDE CHOLIQUE avec l'ACIDE SULFURIQUE et la VANILLINE

Cette réaction se pratique comme la réaction sulfo-furfuralique, mais en remplaçant volume à volume la solution de furfural par une solution aqueuse de vanilline à 0,60 %, c'est-à-dire au voisinage de la saturation.

a.- CINETIQUE :

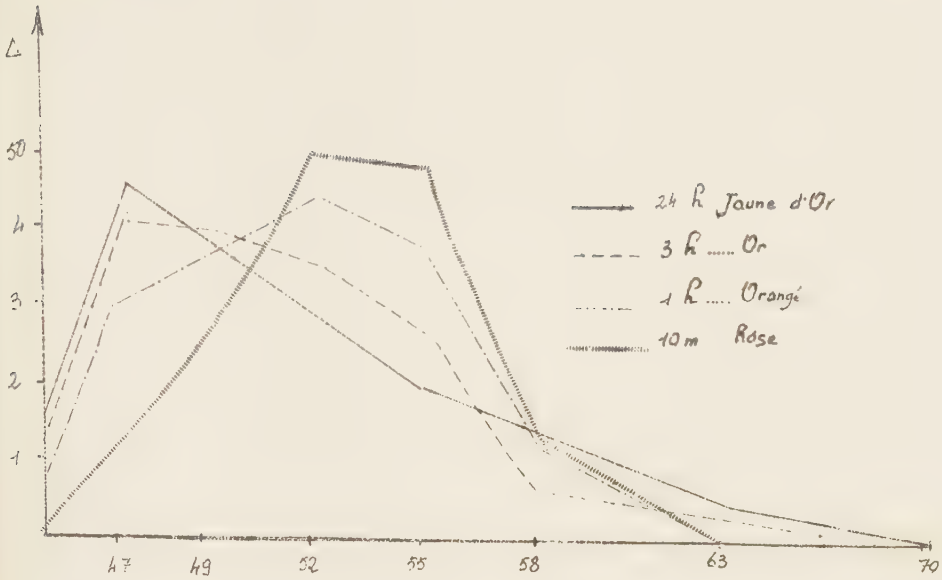
Un des intérêts de la réaction sulfo-vanillique est la régularité de sa cinétique.

En utilisant un acide sulfurique à 60 %, on obtient tout d'abord une teinte rose qui pâlit rapidement, puis vire au bleu. Cette teinte bleue s'intensifie lentement et progressivement durant les 24 premières heures, et ne subit plus, par la suite, qu'un très léger accroissement sans modification de nuance.

Le graphique ci-après, précise cette évolution, et montre comment le maximum d'absorption passe lentement de

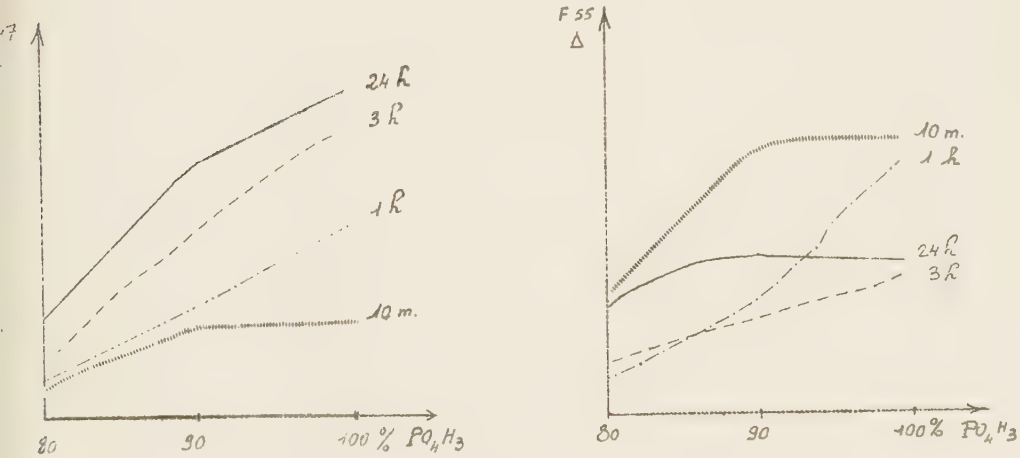
λ = 3.900 Å à λ = 5.800 Å ,

d'où le changement de teinte. (Fig. 16 - 17)

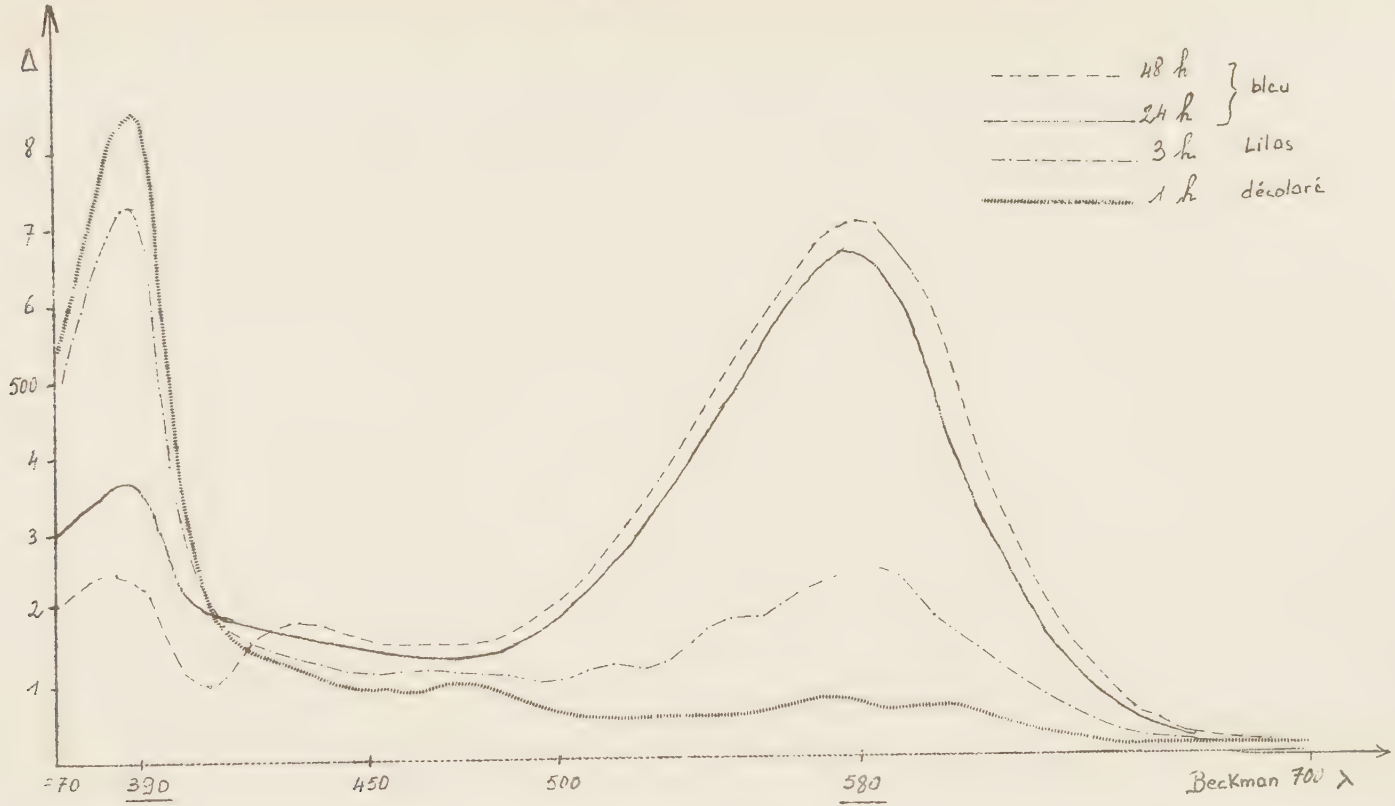


- FIGURE 14.- Réaction de PETTENKOFER sur l'acide cholique, modalité phospho-vanillique (PO_4H_3 100 %).

Densités optiques en fonction de la région spectrale et du temps écoulé depuis le début de la réaction (photomètre à écrans).



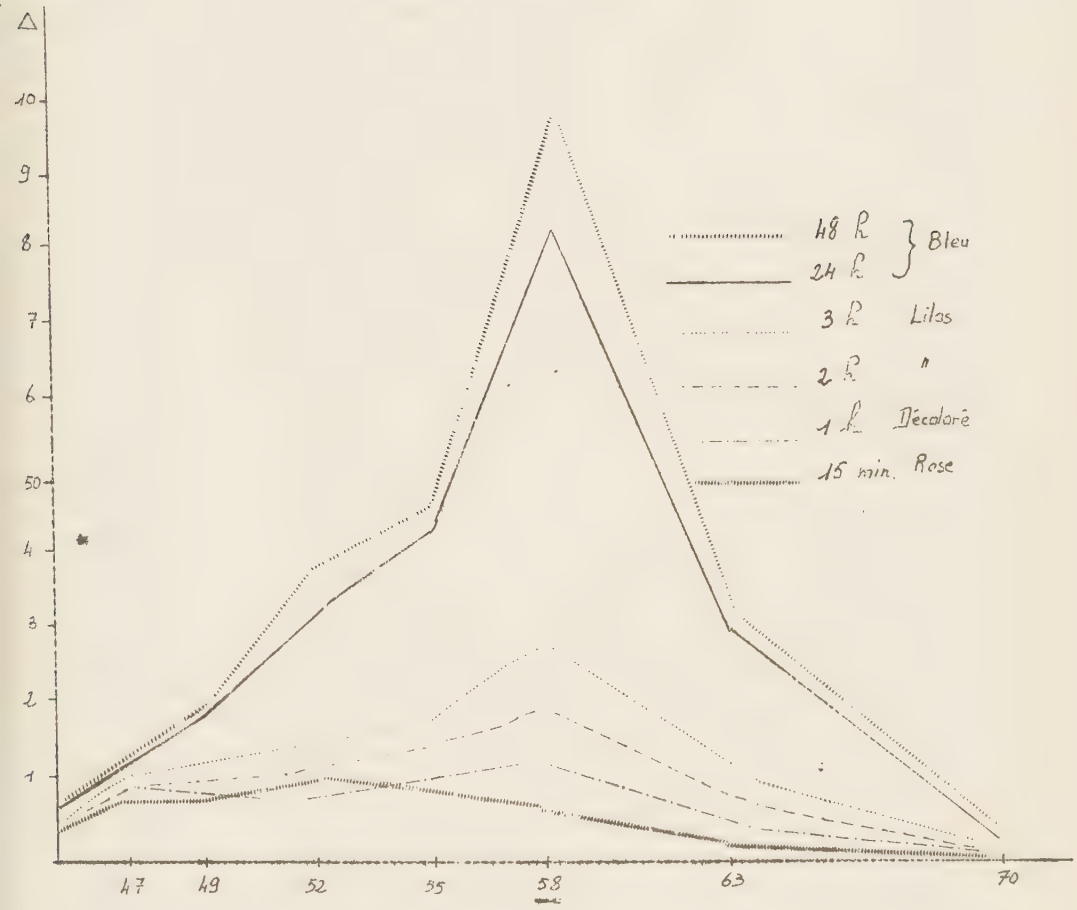
- FIGURE 15.- Influence de la concentration de l'acide phosphorique sur la densité optique de la réaction phospho-vanillique (filtres 47 & 55).



- FIGURE 16.- Réaction de PETTENKOFER sur l'acide cholique, modalité Sulfo-Vanillique (SO_4H_2 à 60 %).

Densité optique en fonction de la longueur d'onde et du temps écoulé depuis le début de la réaction.

[illegible] montre que le maximum d'absorbtion passe progressivement de



- FIGURE 17.- Cinétique de la réaction lue au photomètre à écrans.

Augmentation progressive de la densité optique dans la zone spectrale correspondant à λ 580.

La lecture de cette réaction peut donc être faite dans d'excellentes conditions au bout de 24 heures ou de 48 heures.

De toute façon, dans des études comparatives, le moment de la lecture ainsi que la longueur d'onde ou l'écran, devront être soigneusement définis, en prenant comme référence , pour plus de sûreté l'absorption d'une solution témoin.

La région spectrale de 5.800 Å est particulièrement favorable pour des lectures pratiquées au bout de 24 heures.

b.- TEMPS de CHAUFFAGE :

L'influence du temps de chauffage est assez comparable à ce qu'on observe dans la réaction pratiquée avec l'acide sulfurique et le furfural.

Les graphiques ci-après, montrent que la réaction sulfo-vanillique atteint un maximum auquel elle se maintient en plateau pour une durée de chauffage de 3 à 7 minutes. (Fig.18)

Nous avons adopté 6 minutes comme séjour au bain-marie bouillant.

Certains auteurs préconisent le chauffage, non plus à 100 °, mais à 65° .

Une étude comparative nous a montré qu'un chauffage de 20 minutes à 65°, ou de 6 minutes au bain-marie bouillant, donnaient avec la réaction sulfo-vanillique, pratiquée sur l'acide cholique, des résultats équivalents.

Par contre, aussi bien à 65° qu'à 100°, la réaction est plus intense si l'on introduit la vanilline après chauffage que si l'on procède inversement; mais la cinétique évolue plus lentement. (Fig. 19)

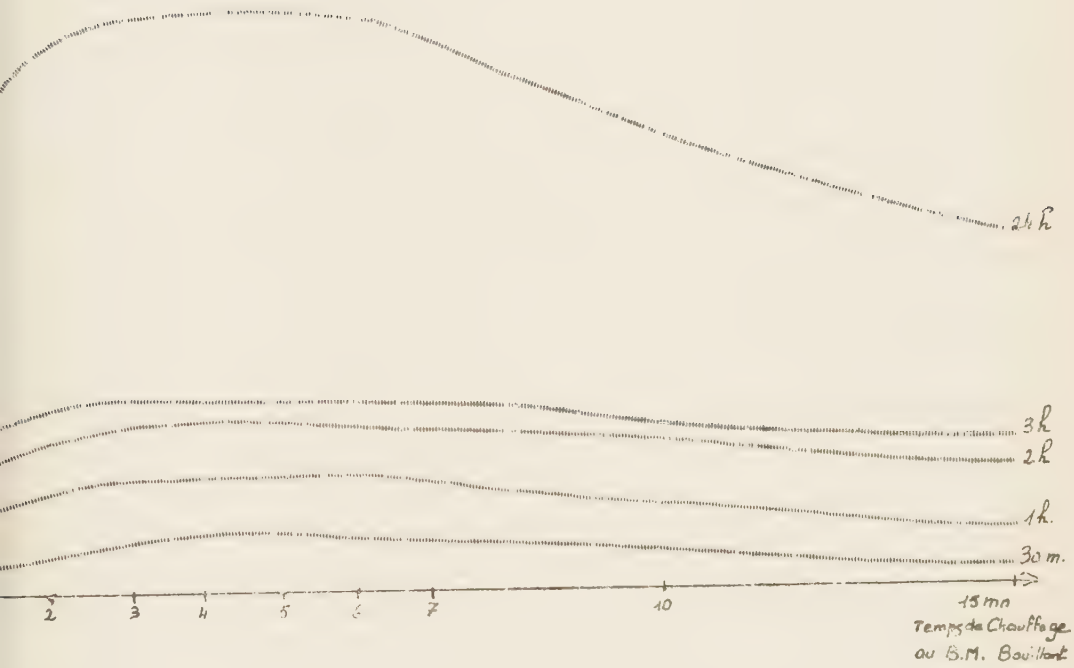


FIGURE 18.- Influence de la durée du temps de chauffage sur la densité optique de la réaction Sulfo-Vanillique pratiquée sur l'acide cholique.

c.- CONCENTRATION de l'ACIDE SULFURIQUE * :

Le taux de l'acide sulfurique joue un rôle important dans l'intensité et la cinétique de la réaction sulfo-vanillique.

L'intensité augmente avec la concentration de l'acide, mais surtout, l'évolution vers la teinte bleue est ralentie, et pour des taux d'acide sulfurique de 80, 90 et 100 % (soit : 57,1 - 64,5 - 71,5 % dans le mélange), cette évolution ne se fait plus, la coloration virant lentement vers une teinte rouge porto .

Ces particularités sont mises en évidence par le diagramme ci-après . (Fig. 20)

La concentration en acide sulfurique à 60 % (43 % dans le mélange, avant l'adjonction de la vanilline) est celle qui, pour l'acide cholique, donne les plus belles réactions.

Nous verrons plus loin que cette concentration relativement faible donne une réaction négative avec l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique.

d.- SOLVANT de l'ACIDE CHOLIQUE :

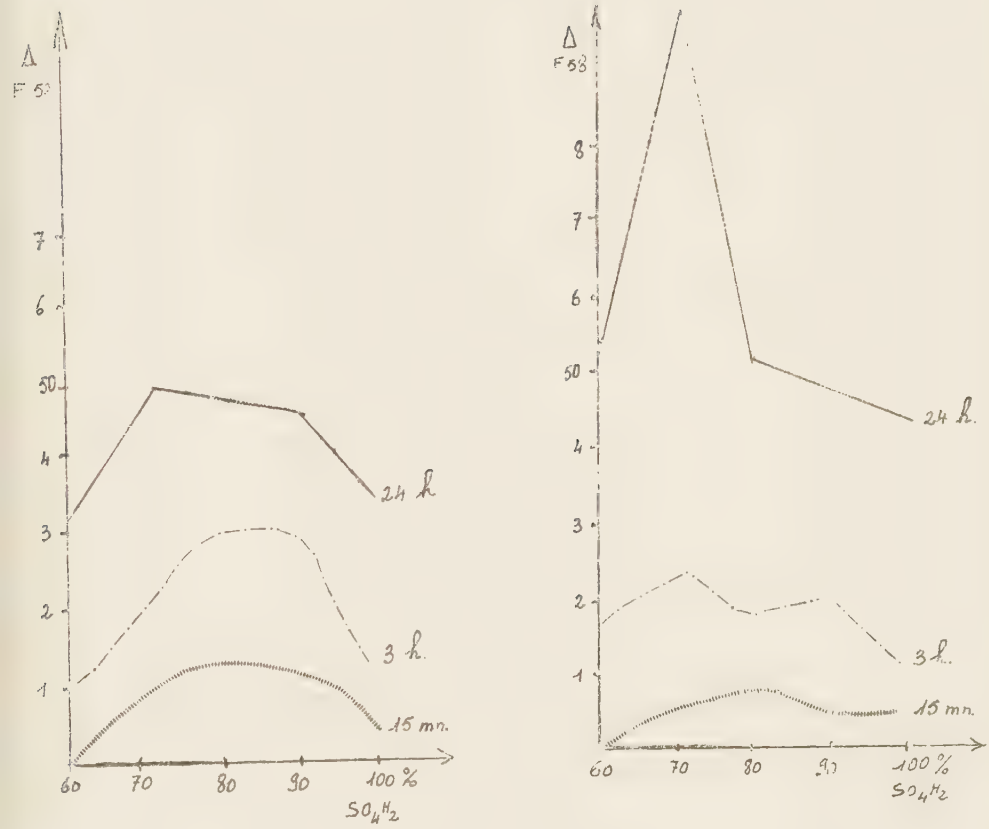
La réaction sulfo-vanillique pratiquée sur l'acide cholique avec un acide sulfurique à 60 % donne des résultats assez comparables, que l'acide cholique soit dissous dans l'eau ou dans le méthanol.

Avec le méthanol, la cinétique est un peu plus rapide, et la teinte bleue obtenue au bout de 24 heures, est d'une intensité un peu plus élevée.

Mais avec des concentrations fortes d'acide sulfurique, 90 et 100 %, le méthanol donne par lui-même une coloration bleue au bout de 24 heures, et fausse les résultats . (Fig.21)

---

* Il est bon de vérifier l'acide sulfurique à utiliser, certains lots de cet acide ne donnant aucune réaction dans les conditions où nous faisons la réaction sulfo-vanillique sur l'acide cholique.



- FIGURE 20.- Réaction Sulfo-Vanillique sur l'acide cholique.

Densités optiques en fonction de la concentration de l'acide sulfurique et du temps écoulé.

- FIGURE 21.- Réaction Sulfo-Vanillique pratiquée sur du méthanol pur (en l'absence d'acides biliaires) ; influence de la concentration de l'acide sulfurique.

C'est pour cette raison que nous employons, dans la réaction de PETTENKOFER comme solvant des acides biliaires, non le méthanol, mais l'eau pure ou légèrement alcalinisée par la soude.

La réaction peut être également effectuée sur un résidu sec avec un acide sulfurique à 43 % .

6.- Densité optique de la réaction sulfo -vanillique en fonction de la quantité d'acide cholique :

Les courbes ci-après montrent la variation de la densité optique obtenue par la réaction sulfo-vanillique sur des quantités croissantes d'acide cholique.

Avec un acide sulfurique à 60 % , la densité optique sous écran 58, varie linéairement jusqu'à une concentration de la solution d'essai de 0,150 g. par litre environ.

Avec un acide sulfurique à 90 ou 100 %, la coloration rouge porto lue au bout de 24 heures sous le même écran, varie également d'une façon linéaire jusqu'à la même concentration. L'absorption est environ moitié de celle que donne la teinte bleue développée dans les mêmes conditions par l'acide sulfurique à 60 % . (Fig. 22)

- EN RESUME :

les différentes modalités de la réaction de PETTENKOFER que nous venons d'examiner, peuvent dans des conditions d'exécution bien définies être indifféremment utilisées pour la caractérisation de l'acide cholique.

Mais nous donnerons la préférence à la réaction sulfo-vanillique , en raison de la régularité de ses indications, de sa sensibilité et, comme nous le verrons plus loin, de sa relative spécificité . *

Cette réaction, de plus, se prête également bien à la différenciation entre l'acide cholique et l'acide désoxycholique; ce que nous étudierons dans un prochain chapitre.

---

* Beaucoup des substances citées par MYLIUS et UDRANSKY (v.p.) donnent une réaction négative (ou ne virent pas au bleu) avec la vanilline et l'acide sulfurique à 60 % .

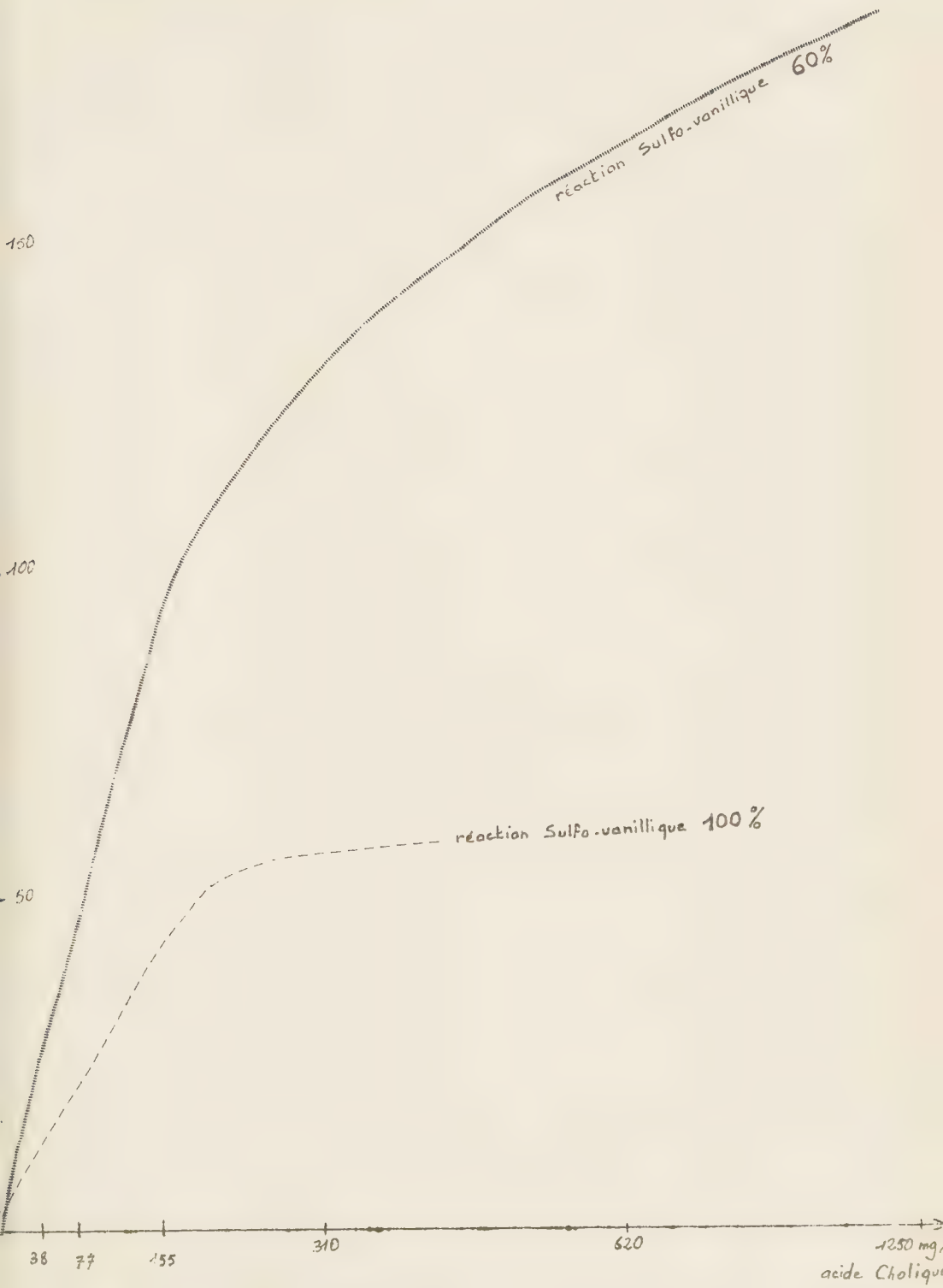


FIGURE 22.- Réaction Sulfo-Vanillique pratiquée avec un acide à 60 ‰ et à 100 % - densités optiques en fonction de la quantité d'acide cholique mise en jeu.

CHAPITRE III

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ALUMINE

Avant d'aborder la séparation des sels biliaires dans les urines, il était indispensable de procéder à une étude chromatographique sur des solutions pures de sels biliaires, ou des mélanges de ces sels.

Pour des raisons d'ordre matériel, nous nous sommes limitée, comme nous l'avons dit, à la chromatographie sur colonne d'alumine.

L'alumine que nous avons utilisée, est une alumine commerciale fournie par les Etablissements PROLABO, alumine dont le grain correspond au tamis 80.

Les caractéristiques d'une alumine sont d'une importance capitale dans tous les problèmes de chromatographie. Elles sont souvent exprimées par l'aptitude à retenir, ou non tel ou tel colorant lorsqu'on fait agir certains éluants.

C'est là la base de classification proposée par BROCKMAN (15) .

Malheureusement, cette méthode ne permet pas de définir d'une façon absolue les qualités d'une alumine, et de préjuger de la façon dont elle se comportera lors de l'application que l'on en a vue.

Deux alumines identiques vis-à-vis de plusieurs matières colorantes peuvent se montrer différentes pour des substances d'autre nature; et dans le problème qui nous occupe, la seule façon de choisir une alumine, est de la tester vis-à-vis des acides biliaires eux-mêmes.

Nous nous en sommes rendu compte, lorsqu'ayant épuisé notre première provision d'alumine, nous avons dû en utiliser une de même origine, mais dont les caractéristiques se sont révélées différentes.

Cette alumine avait l'inconvénient de mal retenir l'acide cholique et l'acide désoxycholique lors du développement de la chromatographie par le méthanol pur.

Mais nous avons pu retrouver nos résultats initiaux soit en exposant cette nouvelle alumine à la vapeur d'eau saturante à 37 ° pendant 48 heures, soit en remplaçant, lors des élutions, le méthanol par un mélange méthanol-éthanol 2 - 1 .

Nous avons eu depuis, entre les mains, une alumine bien standardisée et convenant admirablement à nos recherches.

Il s'agit de l'alumine " WOELM " * activité I, dans l'une quelconque de ses variétés : acide, neutre ou alcaline, dont un échantillon nous a été obligeamment fourni par le Pr. BOURRILLON.

Les résultats que nous exposons ici sont ceux obtenus avec la première alumine PROLABO .

TECHNIQUE

4 Gr d'alumine sont introduits à sec dans une ampoule spéciale en verre, qui n'est autre qu'une ampoule à décantation sans robinet.

La partie essentielle de ce dispositif est un tube cylindrique de 10 mm de diamètre et d'une dizaine de cms de hauteur ; ce tube est surmonté d'un réservoir sphérique d'une cinquantaine de cm3, et prolongé à sa partie inférieure par une tige semi-capillaire.

---

* " WOELM " - Eschwege Hesse -Allemagne -

Un tampon de coton de verre retient, à sa partie inférieure, la colonned'alumine dont la hauteur est de 7 cms.

Un autre tampon protège la partie supérieure de la colonne.

Quelques chocs sur la paroi du tube, assurent une répartition homogène, et un tassement adéquat del'absorbant.

L'appareil étant ainsi garni, on lave une fois l'alumine avec 10 cm3 d'éthanol, puis on charge la colonne encore humide avec 10 cm3 d'éthanol renfermant une quantité d'acides biliaires de l'ordre du centigramme .

Une légère surpression d'air de 10 cm de mercure, accélère l'écoulement, on vérifie que le filtrat ne donne plus la réaction de PETTENKOFER .

ELUTIONS

La colonne chargée d'acides biliaires est soumise à des élutions méthodiques.

Dans un premier temps, on remplit le réservoir sphérique d'alcool méthylique pur et on procède, sous pression de 30 cm de mercure, à 10 élutions successives de 5 cm3 chaque.

L'écoulement de chaque fraction demande 10 minutes environ. Les fractions sont recueillies dans des tubes à essai différents.

Dans un second temps, on remplace l'alcool méthylique pur par du méthanol additionné de 25 °/oo d'ammoniaque * et l'on procède à 20 élutions successives de 5 cm3 .

DETECTION :

Sur 2 cm3 de chacune des 30 élutions, on pratique la réaction de PETTENKOFER suivant la modalité sulfo-vanillique.

---

* Des recherches ultérieures nous ont montré que l'on pouvait se contenter d'un taux d'ammoniaque de 10 ‰.

Tant qu'on expérimente sur le l'acide cholique libre ou conjugué, on utilise un acide sulfurique à 60 %, ce qui peut permettre d'effectuer la réaction directement sur l'éluat méthylique. Mais si le mélange de sels biliaires renferme de l'acide desoxycholique, il convient d'utiliser de l'acide sulfurique concentré à 90 ou 100 % . Il est dès lors, indispensable d'éliminer l'alcool méthylique, qui donnerait à lui seul une coloration, et de le remplacer par une quantité équivalente d'eau distillée.

- RESULTATS :

Seul de tous les acides biliaires que nous avons examinés, l'acide taurocholique est élué par le méthanol pur * . Par contre, les acides glycocholique , cholique, désoxycholique et lithocholique ne sont extraits de l'alumine que par le méthanol additionné d'ammoniaque.

Les figures ci-après objectivent ces résultats. (Fig. 23)

Comme nous avons pu nous en rendre compte par la chromatographie, les échantillons de taurocholate de sodium dont nous disposions, étaient en realité des mélanges de taurocholate et de cholate de sodium (ou de glycocholate). Ils donnaient, en effet, deux vagues d'élution : l'une par l'alcool méthylique pur, l'autre par le méthanol ammoniacal. Après purification chromatographique, une seule vague est demeurée dans chaque fraction. (Fig. 24)

Des expériences de contrôle, nous ont montré que l'adjonction d'ammoniaque à l'alcool méthylique, agissait bien par la base NH_4OH, et non par son eau de dilution . * *

---

* Il ne l'est pas par l'éthanol pur .

* * Cette expérience était nécessaire, étant donné que l'eau distillée pure élue en bloc tous les acides biliaires adsorbés par l'alumine .

Tant qu'on expérimente sur le l'acide cholique libre ou conjugué, on utilise un acide sulfurique à 60 %, ce qui peut permettre d'effectuer la réaction directement sur l'éluat méthylique. Mais si le mélange de sels biliaires renferme de l'acide désoxycholique, il convient d'utiliser de l'acide sulfurique concentré à 90 ou 100 % . Il est dès lors, indispensable d'éliminer l'alcool méthylique, qui donnerait à lui seul une coloration, et de le remplacer par une quantité équivalente d'eau distillée.

- RESULTATS :

Seul de tous les acides biliaires que nous avons examinés, l'acide taurocholique est élué par le méthanol pur * . Par contre, les acides glycocholique , cholique, désoxycholique et lithocholique ne sont extraits de l'alumine que par le méthanol additionné d'ammoniaque.

Les figures ci-après objectivent ces résultats. (Fig. 23)

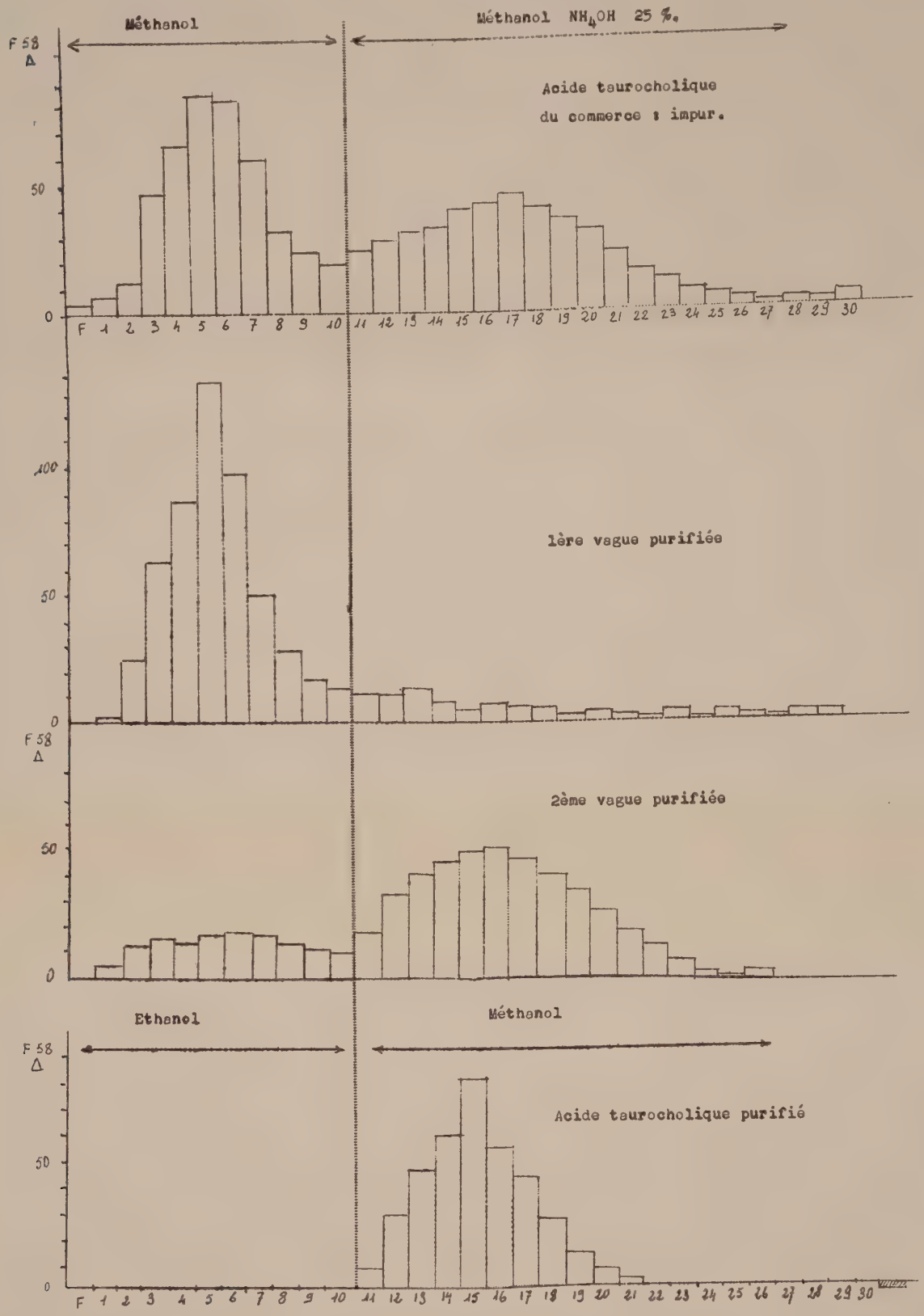
Comme nous avons pu nous en rendre compte par la chromatographie, les échantillons de taurocholate de sodium dont nous disposions, étaient en realité des mélanges de taurocholate et de cholate de sodium (ou de glycocholate). Ils donnaient, en effet, deux vagues d'élution : l'une par l'alcool méthylique pur, l'autre par le méthanol ammoniacal. Après purification chromatographique, une seule vague est demeurée dans chaque fraction. (Fig. 24)

Des expériences de contrôle, nous ont montré que l'adjonction d'ammoniaque à l'alcool méthylique, agissait bien par la base NH_4OH, et non par son eau de dilution . * *

---

* Il ne l'est pas par l'éthanol pur .

* * Cette expérience était nécessaire, étant donné que l'eau distillée pure élue en bloc tous les acides biliaires adsorbés par l'alumine .



- FIGURE 24.- Purification de l'acide taurocholique par chromatographie sur alumine.

- HYDROLYSE du TAUROCHOLATE de SODIUM :

La facile élution du taurocholate de sodium par le méthanol pur, pouvait avoir l'inconvénient, lors d'une éventuelle application de la chromatographie aux urines, de laisser ce corps mélangé à différents pigments ou chromogènes également facilement éluables par l'alcool méthylique.

Aussi nous a-t-il paru intéressant d'hydrolyser l'acide taurocholique de façon à le reporter, en tant qu'acide cholique, dans la vague d'élution alcaline.

Après plusieurs essais, nous avons adopté pour l'hydrolyse, un chauffage au bain-marie bouillant d'une durée de deux heures, après adjonction de 10 % de soude en pastilles à la solution aqueuse de taurocholate de sodium.

Des prélèvements en série, ont pu nous assurer qu'un chauffage dans de telles conditions n'entraînait pas de destruction ni de transformation de l'acide cholique, ainsi libéré.

D'autre part, l'hydrolyse du taurocholate de sodium, c'est-à-dire sa séparation en taurine et cholate de sodium, était bien complète, car lors de la chromatographie sur colonne d'alumine, l'élution par le méthanol pur restait négative . (Fig.24)

Cette dernière chromatographie ne pouvait pas, du reste, être effectuée directement sur l'hydrolysat. L'oxyde d'aluminium n'adsorbe pas en effet, les sels biliaires en solution aqueuse. Il était donc indispensable de pratiquer une extraction des produits d'hydrolyse pour les faire ensuite passer en solution éthylique.

- EXTRACTION des PRODUITS d'HYDROLYSE :

Voici comment nous avons procédé :

L'hydrolysat soigneusement neutralisé par l'acide chlorhydrique est additionné de 6 % de noir animal.

Après quelques minutes de contact à la température du laboratoire, on filtre sur filtre Durieux N° III dans un entonnoir Buchner.

Il est facile de vérifier par stalagmométrie ou par réaction de PETTENKOFER que l'adsorption a été complète.

Le charbon est lavé à plusieurs reprises à l'eau, mis à sécher, pulvérisé, puis repris quatre fois par 20 cm3 de méthanol additionné d'ammoniaque .

Les courbes ci-après montrent les variations du rendement en fonction de la proportion d'ammoniaque utilisée . (Fig.25)

A partir de 80 °/oo , le maximum de rendement est pratiquement atteint ; 70 % environ de l'acide cholique fixé par le charbon sont récupérés . *

---

* La récupération est meilleure dans le cas de l'acide désoxycholique pour lequel le rendement est voisin de 100 % .

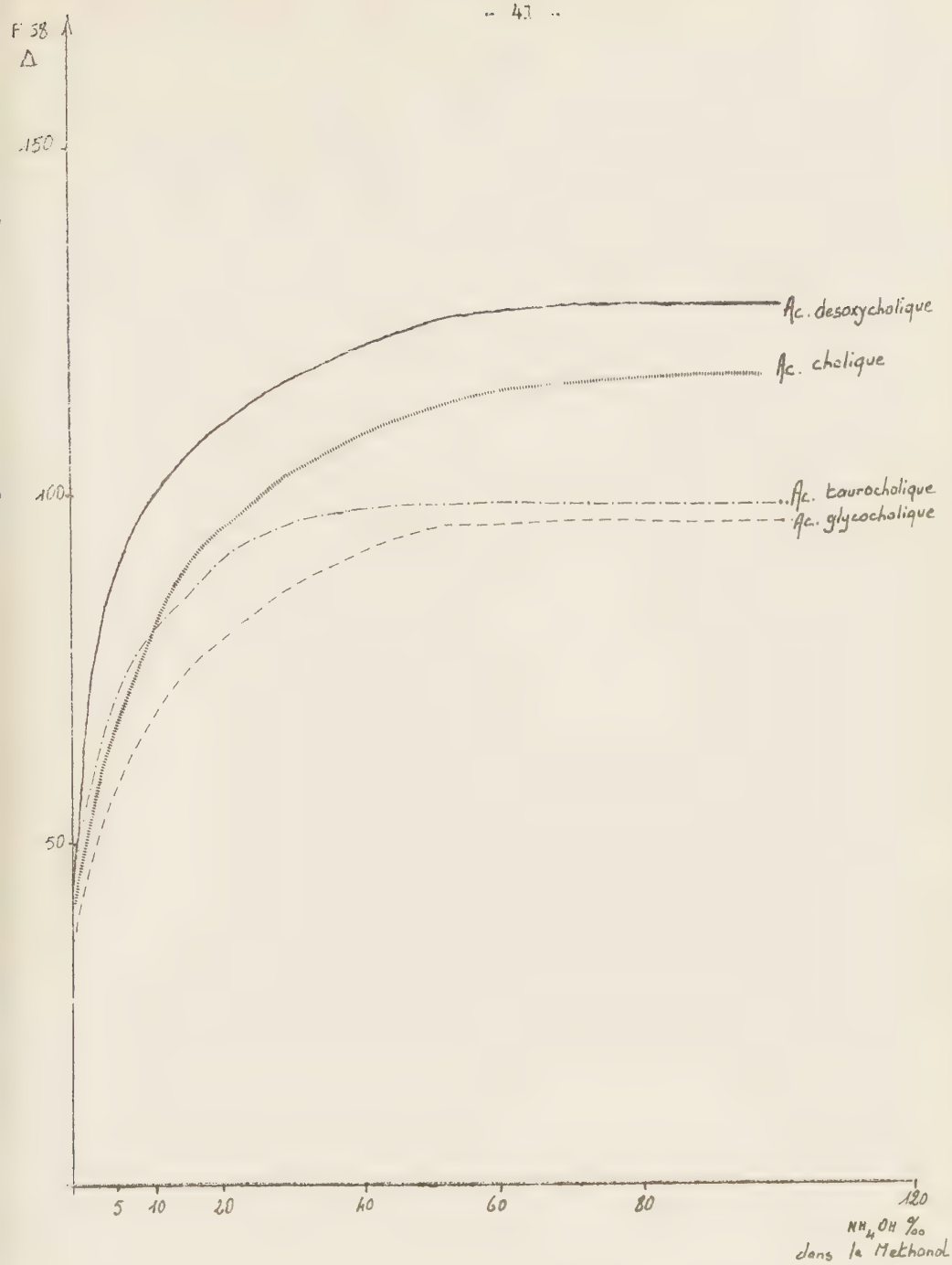


FIGURE 25.- Elution du charbon ayant adsorbé différents acides biliaires.

Influence sur l'élution, du taux d'ammoniaque ajouté au méthanol.

A partir de 80 ‰ , le maximum d'élution est atteint (pour l'acide taurocholique, ce maximum est déjà atteint à 40 ‰)

CHAPITRE IV

ACIDE CHOLIQUE ET ACIDE DÉSOXYCHOLIQUE

ESSAIS de CARACTERISATION SEPAREE

Si l'acide lithocholique ne se trouve pratiquement que dans les calculs biliaires, l'acide désoxycholique et, en particulier, l'acide 3 - 12 dihydroxycholanique, figure en quantité importante à l'état libre ou conjugué dans la bile de l'homme et des différents animaux.

Y. ABE (16) donne les proportions suivantes en grammes pour 100 cm3 :

Origine de la bile	Acide cholique	Acide désoxycholique
Lapin	0,69 - 0,82	18,8 - 19,4
Taureau	4, - 7,40	1,6 - 1,9
Homme	0,1 - 4,10	0,4 - 5,6

Comme on le voit, l'acide désoxycholique est très prédominant dans la bile du lapin, et de même importance que l'acide cholique dans la bile humaine.

En dehors de leur spectre spécifique dans l'infrarouge, l'acide cholique et l'acide désoxycholique ont un certain nombre de propriétés particulières qu'on peut mettre à profit pour leur différenciation.

- LE POINT DE FUSION de leurs cristaux n'est pas le même :

196°- 198° pour l'acide cholique

176°- 177° pour l'acide désoxycholique
3 α - 12 α OH

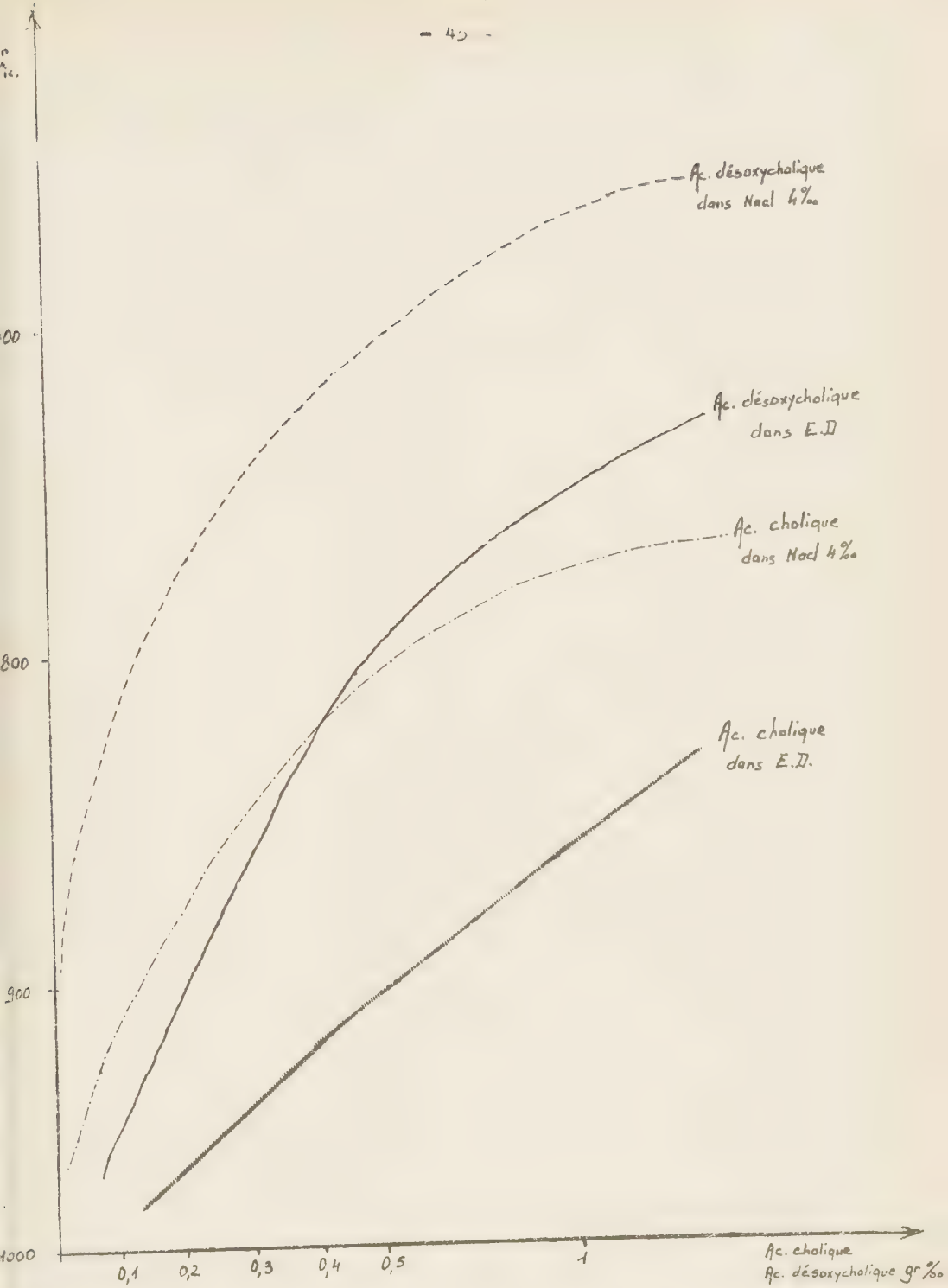
- L'action de l'acide désoxycholique sur la TENSION SUPERFICIELLE est nettement plus marquée que celle de l'acide cholique . (Fig. 26)

- LA RÉACTION DE PETTENKOFER exige des concentrations d'acide phosphorique ou sulfurique beaucoup plus élevées pour l'acide désoxycholique que pour l'acide cholique.

Avec l'acide sulfurique à 60 % (43 % après mélange avec la solution de sel biliaire), la réaction sulfo-vanillique est pratiquement négative avec l'acide désoxycholique. Tout au plus, peut-on soupçonner sa présence par l'apparition d'un léger louche se superposant éventuellement à la coloration bleue donnée par l'acide cholique en cas de mélange.

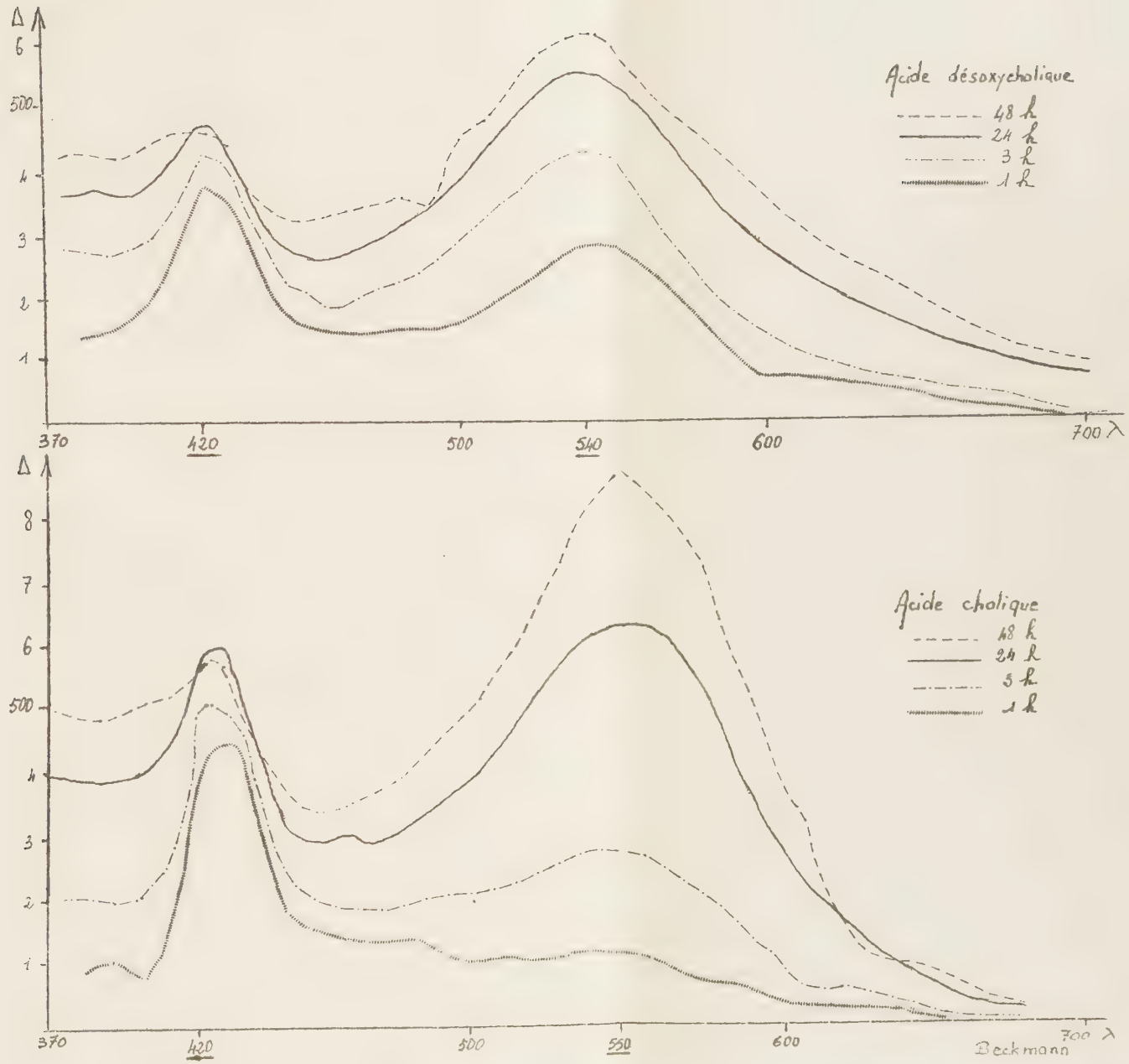
L'acide désoxycholique n'est décelable que si l'on remplace dans la technique, l'acide sulfurique à 60 % par un acide plus concentré, à 90 ou 100 % . La coloration développée tend au bout de 24 heures, vers une teinte rouge porto, comme celle du reste de l'acide cholique traité dans les mêmes conditions (voir p. 28) . Les diagrammes spectrophotométriques sont peu différents pour ces deux acides et pour l'acide lithocholique. (Fig.27)

Jusqu'à une teneur de la solution d'essai de 0,150 g. par litre, l'absorption lue au bout de 24 heures sous écran 58 est directement proportionnelle à la concentration, et à peu près la même que pour l'acide cholique. (Fig.28)



- FIGURE 26.- Influence de quantités croissantes d'acide cholique et d'acide désoxycholique sur la tension superficielle de l'eau distillée et de l'eau chlorurée à 4 ‰.

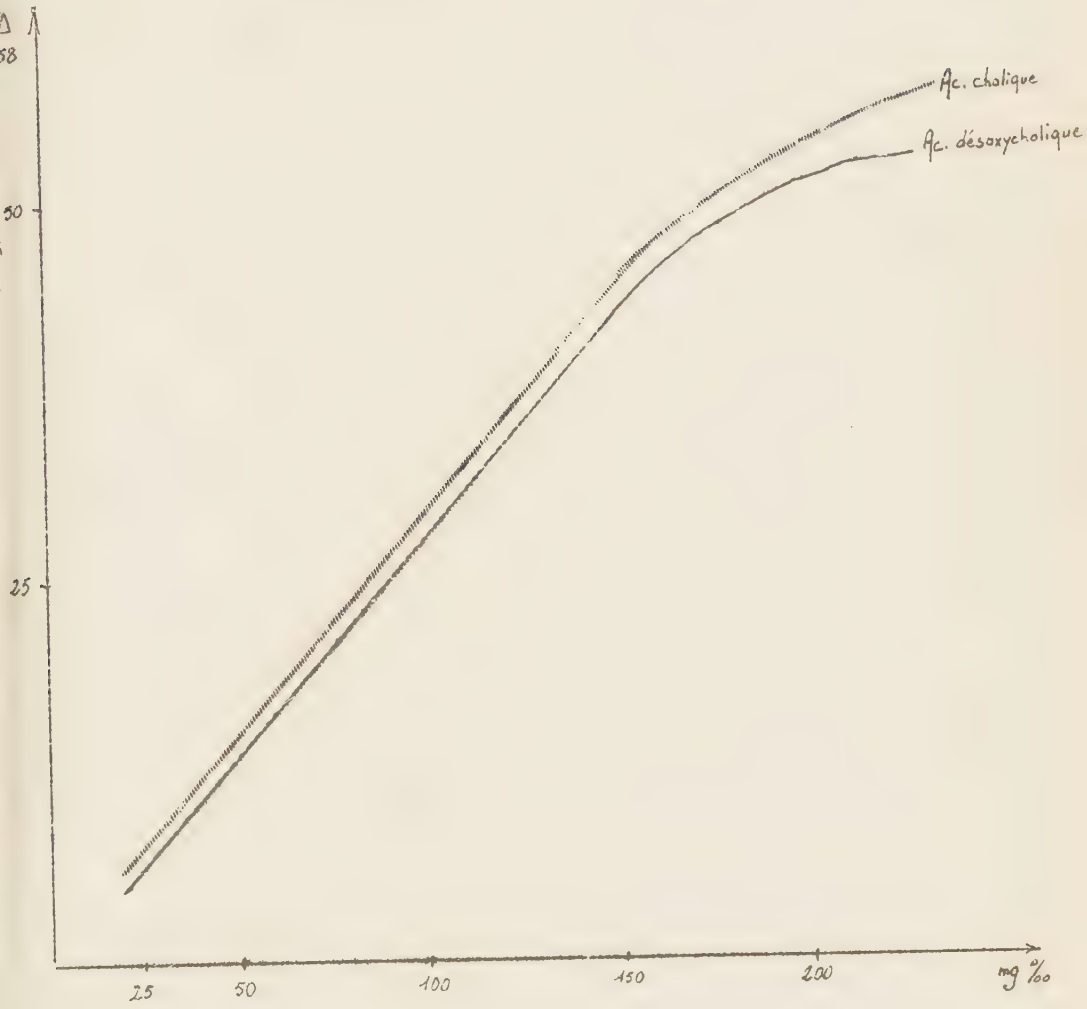
La tension superficielle de l'eau distillée est fixée à 1.000 conventionnellement.



- FIGURE 27.- Réaction de PETIENKOFER, modalité Sulfo-Vanillique (SO4H2 100 %), pratiquée sur les acides cholique et désoxycholique.

Densités optiques en fonction de la longueur d'onde et du temps écoulé depuis le début de la réaction.

On remarquera la similitude des diagrammes.



- FIGURE 28.- Réaction de PETTENKOFER, modalité Sulfo-Vanillique (SO_4H_2 100 %). Densités optiques en fonction de la concentration de l'acide cholique ou désoxycholique (photomètre à écrans, filtre 58).

LA SEPARATION réciproque des acides cholique et désoxycholique peut être obtenue par différentes méthodes.

WIELAND, SEIBERT et MATSUO HEKI (17) * ont montré que si l'on agite une solution éthérée d'un mélange de ces deux corps avec un acide chlorhydrique à 15 %, l'acide cholique passe seul dans la phase aqueuse, alors qu'il faut une concentration de 25 % pour retirer de l'éther l'acide désoxycholique.

Nous avons même procédé de façon différente et recherché le pH spécifique qui permet l'extraction quantitative par l'éther des acides cholique et désoxycholique en solution aqueuse .

Comme l'indiquent les courbes ci-après , (Fig. 29) l'acide désoxycholique est extrait en totalité à pH 7, alors que tout l'acide cholique reste dans la phase aqueuse; celui-ci ne commence à passer dans l'éther qu'au-dessous de pH 6, l'extraction complète n'étant réalisée qu'à pH 3 .

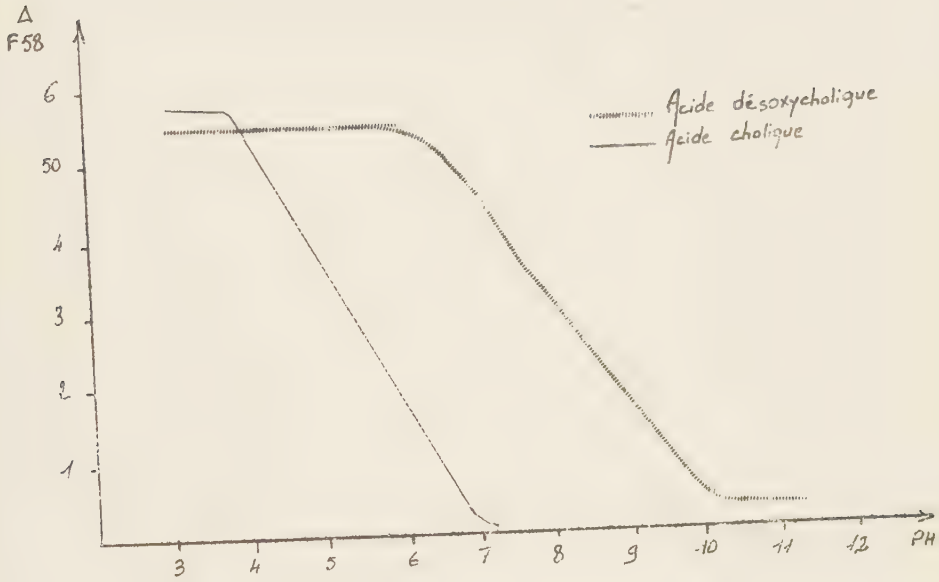
Les acides glycocholique et taurocholique ont des diagrammes d'extraction peu différents de ceux de l'acide cholique.

Comme nous l'avons rappelé au début de ce travail, divers procédés de CHROMATOGRAPHIE ont été utilisés pour séparer l'un de l'autre les différents acides biliaires.

Ainsi que nous avons pu le vérifier, une bonne méthode est celle de BERGSTROM et SJOVALL . Elle est basée sur la "Reversed phase partition chromatography " de HOWARD et MARTIN . Il s'agit là d'une chromatographie de partage sur colonne de terre d'infusoires, mais à l'inverse des conditions habituellement réalisées, c'est la phase la moins polaire (c'est-à-dire privilégiée au point de vue

---

* Les acides biliaires sont peu solubles dans l'éther, et l'adjonction d'un grand volume d'éther est souvent utilisée pour les précipiter de leurs solutions concentrées.
Mais, en réalité, de petites quantités d'acides biliaires sont susceptibles d'être mises en solution dans l'éther au point que celui-ci peut,dans certaines conditions, servir de liquide d'extraction. Cette extraction par l'éther a déjà été utilisée par plusieurs auteurs, et notamment en France , par Mr.HARLAY.



- FIGURE 29.- Extraction par l'éther de solutions aqueuses d'acides biliaires (ac. cholique à 0,01 %, ac. désoxycholique à 0,02 %), à différents pH.

Réaction Sulfo-Vanillique pratiquée à 60 % pour l'acide cholique, à 100 % pour l'acide désoxycholique.

L'extration de l'acide désoxycholique commence à un pH beaucoup plus élevé que celle de l'acide cholique.

du coëfficient de partage) qui représente la phase fixe, tandis que la phase la plus mobile est constituée par la phase la plus polaire.

Cette " reversion " dans la position respective des deux phases est rendue possible par la modification qu'apporte aux propriétés de la terre d'infusoires (Hyflo-Supercel) une exposition préalables de 24 heures aux vapeurs de diméthyldichlorosilane.

La TECHNIQUE est la suivante :

- la terre d'infusoires bien sèche est exposée en couche mince dans un récipient clos renfermant une petite quantité de diméthyldichlorosilane.

Au bout de 24 heures, cette poudre est lavée à l'alcool méthylique et séchée plusieurs heures à l'étuve à 100°.

4 g,5 d'Hyflo-Supercel ainsi traités, sont additionnés de 4 cm3 de chloroforme-heptane 9 - 1 , qui représenteront la phase fixe de qualité peu polaire. Le mélange est suspendu dans de l'alcool méthylique - eau 55 % , et introduit méthodiquement dans un tube de 10 mm de diamètre. L'extrait à séparer , incorporé dans une petite quantité de méthanol à 55 % est versé à la partie supérieure de la colonne .

On procède ensuite au développement à l'aide de la phase mobile (méthanol 55 %) sous une pression de 5 cm de mercure. On recueille 20 fractions de 3 cm3 .

La réaction de PETTENKOFER pratiquée avec des acides sulfuriques à 60 et 100 % , montre que l'acide cholique passe dans les fractionnements 1 à 5 , et l'acide désoxycholique dans les fractionnements 6 à 20 .

CHAPITRE V

APPLICATION AUX URINES

Il importait tout d'abord de vérifier si l'hydrolyse alcaline des urines, en reportant la totalité des acides biliaires dans la seconde phase de l'élution chromatographique, permettait de séparer effectivement ces acides des substances adventices susceptibles d'interférer avec eux, dans la réaction de PETTENKOFER.

Dans ce but, nous avons préparé, suivant la technique indiquée plus loin (voir p. 52) , un extrait éthylique d'urines ictériques hydrolysées , et avons soumis cet extrait à la chromatographie sur colonne d'alumine.

Nous avons, comme précédemment, pratiqué 10 élutions de 5 cm3 d'alcool méthylique pur, puis 15 autres de 5 cm3 d'alcool méthylique additionné de 25 °/oo d'ammoniaque. (Le méthanol ammoniacal à 10 °/oo peut suffire) .

Sur une partie aliquote de ces 35 éluats, nous avons effectué une réaction sulfo-vanillique en utilisant un acide sulfurique à 60 % .

Nous avons constaté que dans les éluats de 1 à 6, existait un chromogène donnant une coloration rouge par la réaction sulfo-vanillique. Cette coloration rouge est assez semblable à celle qu'on obtient, au début, avec l'acide cholique , * elle montre,

---

* Cette réaction est beaucoup plus intense si on la pratique en milieu méthylique que si l'on évapore le méthanol pour le remplacer par une quantité équivalente d'eau distillée. Cette particularité ne tient pas à une intervention du méthanol lui-même dans la réaction sulfo-vanillique, car pratiquée avec un acide à 60 % cette réaction est négative avec l'alcool méthylique pur. (voir p. 29) .

comme cette dernière, une absorption maxima aux environs de 3.900 Å mais à l'inverse de ce que l'on observe avec l'acide cholique, la coloration reste rouge et ne vire pas au bleu . (Fig 30)

L'acide cholique, lorsqu'il existe dans les urines, passe exclusivement dans l'élution par le méthanol ammoniacal. Il donne, avec l'acide sulfurique à 60 % et la vanilline, une coloration qui au bout de 24 heures vire à un bleu très franc. Cette coloration s'étale sur une dizaine d'éluats avec un maximum pour les tubes 16 - 17 - 18. (Fig. 31)

Ainsi donc, l'hydrolyse alcaline des urines ictériques suivie de la chromatographie sur colonne d'alumine, permet un isolement satisfaisant de l'acide cholique, écartant l'interférence d'un chromogène gênant, lors de sa caractérisation par la réaction de PETTENKOFER.

Ces études préliminaires nous ont conduite à simplifier la technique, à recueillir en une seule fois la totalité de l'éluat par le méthanol-ammoniacal, et à pratiquer sur une seule partie aliquote, après évaporation et reprise par l'eau, la réaction sulfo vanillique avec un acide sulfurique à 60 % .

Voici la TECHNIQUE que nous proposons pour la recherche et le dosage des acides biliaires dans les urines :

A - EVALUATION DE L'ACIDE CHOLIQUE

50 Cm3 d'urines sont additionnés de 5 g. de soude en pastilles et chauffés au bain-marie bouillant pendant 2 heures.

Après refroidissement, on neutralise par de l'acide chlorhydrique concentré.

On introduit dans le mélange 3 g. de noir animal qu'on laisse en contact durant quelques minutes à la température du laboratoire.

Le charbon est séparé, lavé abondamment à l'eau distillée (150 à 200 cm3), mis à sécher et pulvérisé.

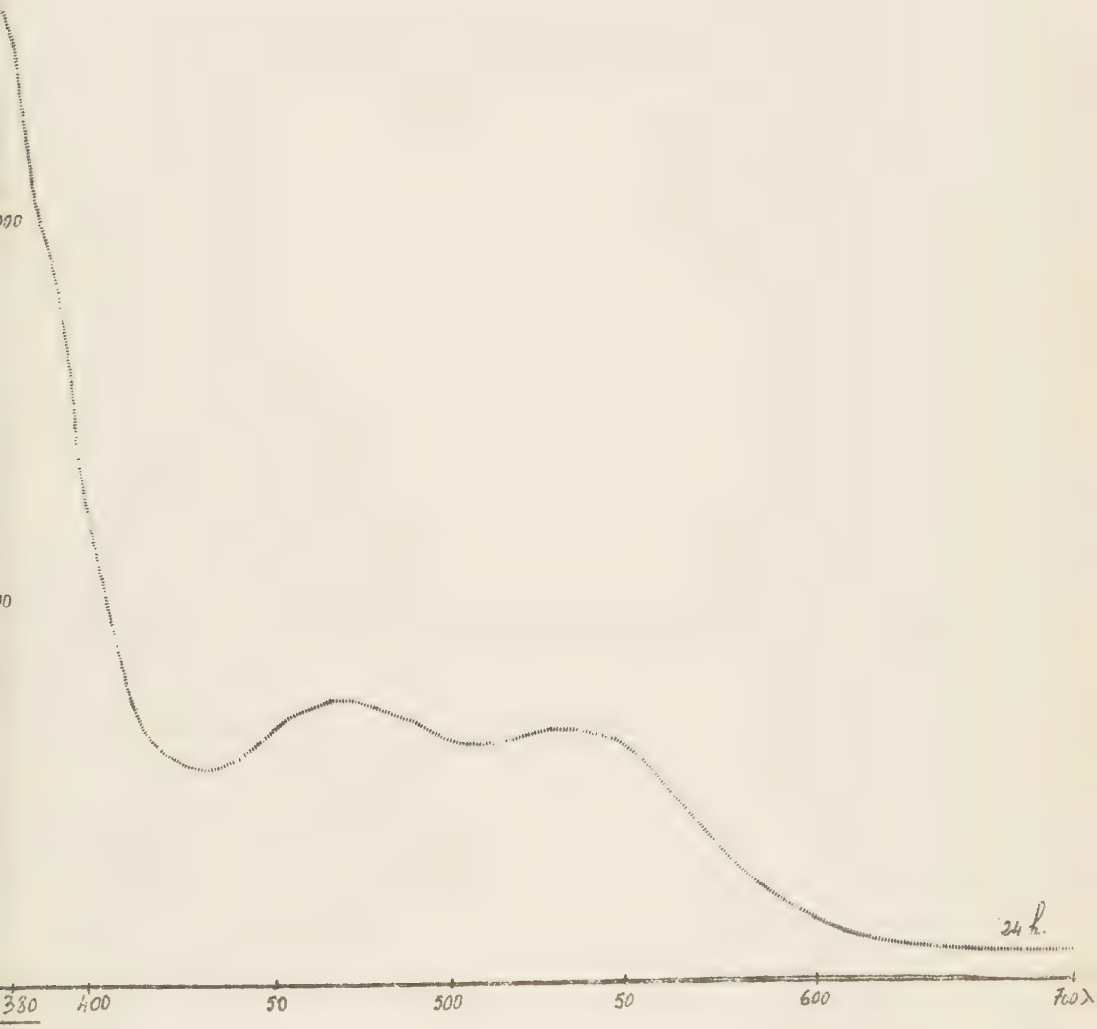
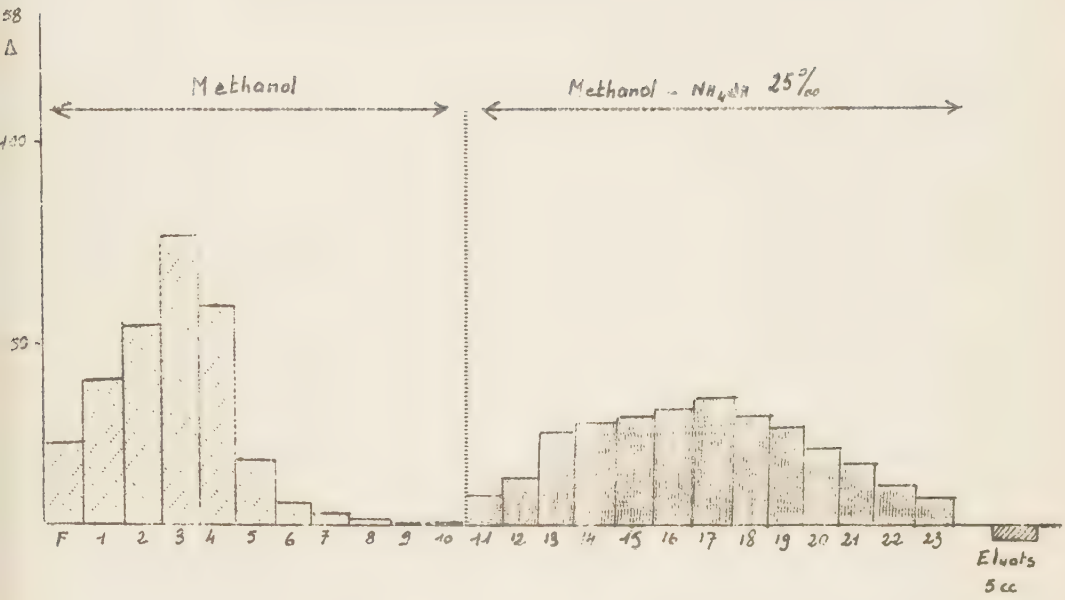


FIGURE 30.- Réaction Sulfo-Vanillique (SO4H2 60 %) pratiquée sur un chromogène de l'urine normale.

Diagramme spectrophotométrique effectué au bout de 24 heures.

Le maximum reste au niveau de λ 380 au lieu de passer comme pour l'acide cholique à λ 580.



- FIGURE 31.- Urines ictériques. La chromatographie sur alumine a permis de séparer un chromogène donnant avec la réaction Sulfo-Vanillique à 60 % une réaction rouge ne virant pas au bleu comme le fait l'acide cholique.

Il est ensuite élué à quatre reprises par 20 cm3 de méthanol additionné de 80 °/oo d'ammoniaque.

Les éluats sont réunis, évaporés à sec au bain-marie bouillant, et le résidu est repris par 10 cm3 d'éthanol absolu.

Cet extrait est versé sur une colonne d'alumine (4 g., hauteur 7 cm, diamètre 10 mm) préalablement lavée par 10 cm3 d'éthanol, et encore humide.

L'adsorption est faite lentement, l'écoulement des 10 cm3 étant effectué en 30 minutes environ, sous pression de 10 cm de mercure.

On procède alors, sous pression de 30 cm de mercure à une première élution par 50 cm3 de méthanol pur. Cet éluat qui ne renferme que des pigments et des chromogènes est écarté.

Une seconde élution est alors pratiquée avec 70 cm3 de méthanol additionné de 10 ou 25 °/00 d'ammoniaque.

L'éluat recueilli en totalité est évaporé à sec et repris par 10 cm3 d'eau distillée.

C'est sur cet extrait qu'on pratiquera la réaction sulfo-vanilliquo :

1 cm3 est addidionné de 2,5 cm3 d'acide sulfurique à 60 % (en volume). On assure le mélange et on place au bain-marie bouillant pendant 6 minutes.

Après refroidissement, on ajoute 0,75 cm3 de vanilline à 0,60 % (Tube I) .

Parallèlement, un blanc est effectué (Tube II) par une réaction similaire dans laquelle la vanilline est remplacée par l'eau distillée.

D'autre part, une réaction étalon (Tube III) est pratiquée sur une solution d'acide cholique à 0,1 °/oo.

Les lectures sont faites le lendemain, contre de l'eau distillée, au photomètre tricellule JOBIN-YVON,

filtre 58 ; elles fourniront la concentration de l'acide cholique dans l'extrait.

Soit X cette concentration en grammes par litre

d1 la densité optique du tube I

d2 la densité optique du tube II

d3 la densité optique du tube III

on a :

$$X = \frac{d1 - d2}{d3} \cdot 0,1$$

Les 50 cm3 ayant été ramenés à 10 cm3 d'extrait, c'est-à-dire concentrés, de ce fait, 5 fois, la quantité Q d'acide cholique contenue dans l'urine est , en grammes par litre :

$$Q.\ chol. = \frac{1}{5} \cdot \frac{d1 - d2}{d3} \cdot 0,1$$

soit

$$Q.\ chol. = \frac{d1 - d2}{d3} \cdot 0,02$$

Le résultat devra toutefois être multiplié par 1,4, pour tenir compte de la perte lors de l'élution du noir animal.

- EVALUATION DE L'ACIDE DESOXYCHOLIQUE

Cette évaluation est beaucoup plus difficile que celle de l'acide cholique, car la caractérisation de l'acide désoxycholique nécessite, comme il a été dit, un acide sulfurique très concentré.

Or, les recherches que nous avons faites sur des urines normales semblent indiquer qu'il existe , dans la vague d'élution alcaline, un chromogène indifférent à l'acide sulfurique à 60 % mais réagissant avec l'acide sulfurique plus concentré et

pouvent fausser, de ce fait l'évaluation de l'acide désoxycholique.

L'élimination de ce chromogène est à l'heure actuelle à l'étude, mais nos résultats ne sont pas encore suffisants pour que nous puissions considérer comme applicables, sans quelques réserves, aux urines les méthodes de dosage de l'acide désoxycholique que nous avons vues valables pour des mélanges d'acides biliaires purs.

Certains essais nous permettent cependant d'entrevoir dans quel sens peut être envisagée la solution.

C'est ainsi que la méthode de "Reversed partage chromatography " intervenant sur l'extrait d'élution alcaline après chromatographie sur alumine, permet (voir p. 50) de séparer l'acide désoxycholique tardivement éluable, de l'acide cholique élué en premier.

Or, le chromogène gênant la caractérisation de l'acide désoxycholique passe pour une grande part, en même temps que l'acide cholique, et se trouve, de ce fait, dans une certaine mesure éliminé .

Une méthode plus simple semble également susceptible de fournir des résultats intéressants .

Elle consiste à reprendre l'extrait aqueux du résidu terminal de la chromatographie sur alumine - extrait aqueux dont une partie aliquote a servi au dosage de l'acide cholique (mais dont il reste encore 8 cent.cubes) - à porter cet extrait à pH 7 et à le soumettre à trois extractions successives par un égal volume d'éther.

Au cours de cette opération, la totalité de l'acide désoxycholique passe dans l'éther, alors que l'acide cholique et une grande partie des chromogènes gênants restent dans la phase aqueuse .

Les éthers réunis, sont évaporés à sec; ils donnent un résidu renfermant l'acide désoxycholique quantitativement, mais encore mélangé à une certaine proportion de chromogènes adventices. C'est sur ce résidu,repris par l'eau qu'on pourrait pratiquer la réaction sulfo-

vanillique avec un acide à 100 % .

La teinte obtenue serait lue au bout de 24 heures sous l'écran 58 et comparée à celle fournie par une solution étalon d'acide désoxycholique à 0,10 °/oo .

La vanilline prenant sous l'influence de l'acide sulfurique concentré une teinte jaune assez prononcée, il serait bon de faire un témoin supplémentaire (Tube IV) , renfermant de l'eau distillée, de l'acide sulfurique et de la vanilline.

Mais de toute façon, l'évaluation de l'acide désoxycholique ne pourra être que grossièrement approximative étant donné l'impossibilité d'écarter complètement de la réaction les chromogènes interférents qui en altèrent les résultats .

Nous avons examiné 10 urines normales et 15 urines ictériques.

A.- URINES NORMALES

Sur des urines normales, même en opérant sur des quantités de l'ordre de un à deux litres, nous n'avons pas pu déceler la présence d'acide cholique.

La réaction sulfo-vanilliqué à 100 %, nous a donné avec l'extrait d'élution par le méthanol ammoniacal, une légère teinte porto, mais nous ne nous croyons pas autorisée à considérer cette réaction comme traduisant la présence de petites quantités d'acide désoxycholique. Au cours de la réaction sulfo-vanillino à 60 %, nous n'avons pas, en effet, remarqué la présence d'un léger louche que donne, dans ces conditions l'acide désoxycholique.

B.- URINES ICTERIQUES

Dans les urines recueillies chez des sujets atteints de différentes affections hépato-biliaires, nous avons pu mettre en évidence la présence d'acide cholique en petites quantités.

La réaction sulfo-vanilliqué pratiquée sur l'extrait urinaire à partir du charbon, sans le secours de la séparation chromatographique, s'est par contre montrée ininterprettable.

Les quantités d'acide cholique trouvées dans les urines de nos malades ictériques, ont toujours été faibles, de l'ordre du centigramme par litre le plus souvent. Il est vrai que nous n'avons pas eu l'occasion d'observer des ictères tout à leur début, et on sait que la cholalurie s'affaiblit rapidement au cours del'évolution de la jaunisse.

Quant à l'acide désoxycholique, il nous a paru, avec toutes les réserves que comporte son estimation, d'un ordre de grandeur supérieur à celui de l'acide cholique.

De nos études sur les urines ictériques, paraissent se dégager deux notions :

D'une part, les quantités d'acides biliaires trouvées dans les urines ne paraissent pas en accord avec les données fournies par la tension superficielle . Les concentrations relevées sont, en effet, insuffisantes pour rendre compte, même en présence d'électrolytes, de l'abaissement de la tension superficielle des urines (voir tableau page suivante).

D'autre part, la quantité d'acide désoxycholique éliminée par les urines chez les ictériques paraît, autant qu'on puisse en juger, supérieure à celle de l'acide cholique.

ABE donne, pour la bile, des proportions des deux acides à peu près équivalentes (voir p. 43) .

Quels sont les processus physiologiques qui règlent, au niveau du foie, du rein et des autres tissus, le métabolisme réciproque des acides cholique et désoxycholique ?

Ce sont là des points dont nous comptons faire prochainement le complément de notre étude .

RESULTATS DE DOSAGES D'ACIDES BILIAIRES

PRATIQUES SUR DES URINES DE SUJETS ICTERIQUES.

Tension superficielle E.D = 1000	Ac. choliquc mmgr °/oo	Ac.désoxychol. mmgr. °/oo (chiffres approx.)	Diagnostic
820	8,8	16	Ictère chez un éthylique
770	23,5	41	Cancer de la tête du pancréas
795	4,8	42	Cirrhose avec ictère
800	11,3	19	Cancer secondaire du foie
740	12	29	Ictère à déterminer
900	3,9	9,9	Ictère infectieux prolongé
800	6,3	18	Ictère à déterminer
845	8,7	50	Ictère infectieux
835	11,3	10	Ictère infectieux
850	12,5	12	Ictère infectieux
870	14,7	19,6	Ictère par rétention
785	18,2	21	Ictère infectieux
810	14	19,8	Ictère infectieux
790	14	38	Ictère infectieux
722	83	60	Cancer secondaire du foie .

CONCLUSIONS

A - La réaction de PETTENKOFER pratiquée avec l'acide sulfurique à 60 % et la vanilline, donne avec l'acide cholique une réaction rose virant au bleu au bout de 24 heures .

Elle est négative pour ce taux d'acide sulfurique, avec l'acide désoxycholique, qui exige pour être décelé, un acide sulfurique beaucoup plus concentré.

B - Au cours de la chromatographie sur colonne d'alumine, seul, l'acide taurocholique est facilement éluable par le méthanol pur. Les acides glycocholique, cholique et désoxycholique, ne le sont que par le méthanol additionné d'ammoniaque (à 10 ou 25 °/oo).

C - Un chauffage à 100° pendant deux heures, en présence de 10 % de soude, hydrolyse sans altération les acides biliaires conjugués, et reporte de ce fait l'acide taurocholique à l'état d'acide cholique, dans la zone d'élution par le méthanol ammoniacal.

D - Cette étude préliminaire nous a conduite à proposer une technique de recherche et d'évaluation de l'acide cholique dans les urines et d'approximation seulement de l'acide désoxycholique.

E - Sur des urines normales, même en opérant sur un volume de 1 à 2 litres, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'acide cholique, ni, compte tenu des réserves précédemment énoncées, d'acide désoxycholique.

Sur des urines recueillies au cours d'ictères datant déjà de 5 à 15 jours, nous avons trouvé des taux d'acides biliaires de l'ordre de quelques centigrammes par litre.

Celui de l'acide désoxycholique nous a paru supérieur à celui de l'acide cholique.

F - Nous n'avons pas observé de corrélation significative entre la quantité d'acides biliaires décelée par la réaction de PETTENKOFER, et le degré d'abaissement de la tension superficielle.

Les quantités d'acides biliaires trouvées sont, en effet, insuffisantes pour expliquer, même en présence d'électrolytes, l'importance de cet abaissement .

VU & PERMIS D'IMPRIMER

Le RECTEUR de l'ACADEMIE de PARIS,

J. S A R R A I L H

Le DOYEN de la FACULTE de MEDECINE de PARIS,

L. B I N E T

Le PRESIDENT de la THESE :

Maurice B A R I E T Y

BIBLIOGRAPHIE

On trouvera dans l'article de F. TAYEAU

" Biochimie des acides biliaires "

(Exposés annuels de Biochimie Médicale 1949 - p.251 à 308)

une bibliographie très complète .

Nous ne mentionnerons ici que quelques travaux que nous avons plus spécialement consultés.

1 - CHABROL E, BENARD H., BARIETY M.
Presse Médicale 1928 - 36 - 849.

2 - CRIPPA GB. , MAFFEI S.
Ann. Chim. Appl. 1941 - 31 - 453 .

3 - TETSUZO , ARIMA .
Journ. of Biochem. 1955 - 42 - 169 .

4 - BERGSTROM S., SJOVALL J.
Acta Chem. Scand. 1951 - 5 - 1267 .

5 - HOWARD C.A. and MARTIN A.J.P.
Biochem. J. 1950 - 46 - 532 .

6 - AHRENS Yr EH, CRAIG L.C.
Journ. Biol. Chem. 1952 - 195 - 763 .

7 - KRITCHEVSKY D., KIRK M.R.
J. Amer. Chem. Soc. 1952 - 74 - 4713 .

8 - TANAKA K. et TANAKA K.
J. Biochem. 1952 - 39 - 333 .

9 - SJOVAL J.
Acta Chemica Scand. 1952 - 6 - 1552 .

10 - LAMBIOTTE M.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1955 - 37 - 1031 .

11 - MOORE et STEIN
Jorn. of. Biol. Chem. 1951 - 192 - 663

12 - PETTENKOFER .
Ann. Chem. Pharm. 1844 - 52 - 90

13 - MYLIUS
Z. Physiol. Chem. 1887 - 11 - 492

14 - UDRANSKY
Z . Physiol. Chem. 1888 - 12 - 377

15 - BROCKMANN H., SHADDER B.
Angew. Chemie 1941 - 74 - 73

16 - ABE Y.
J. Biochem. 1937 - 25 - 181

17 - WIELAND, SEIBERT, MATSUO HEKI
Z. Physiol. Chem. 1939 - 262 - I .